

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Sénescence induite prématurément par des stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chez des fibroblastes humains IMR-90 exprimant la télomérase

Parmentier, Marion

*Award date:*  
2003

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



---

**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX  
NAMUR**

**Faculté des Sciences**

**Sénescence induite prématurément par des stress sous  $H_2O_2$  chez des fibroblastes humains  
IMR-90 exprimant la télomérase**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
licencié en Sciences biologiques**

**Marion Parmentier**

**Juin 2003**

VTS 20045662

**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix**  
**FACULTE DES SCIENCES**  
Secrétariat du Département de Biologie  
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR  
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20  
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

**Sénescence induite prématurément par des stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chez des fibroblastes humains  
IMR-90 exprimant la télomérase**

PARMENTIER Marion

Résumé

L'exposition de fibroblastes humains à divers types de stress subcytotoxiques, entraîne l'apparition d'une sénescence cellulaire prématurée (SIPS). Ce phénotype est caractérisé par l'apparition de plusieurs biomarqueurs. Parmi ceux-ci, on trouve une morphologie cellulaire typique, une activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence (S-A  $\beta$ -gal), la surexpression de certains gènes associés à la sénescence dont la fibronectine, l'ostéonectine, SM22 et l'apolipoprotéine J et un arrêt irréversible du cycle cellulaire. Au cours de ce mémoire, nous avons étudié le rôle de la télomérase dans l'apparition de ces caractéristiques après un stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nous avons, d'une part, montré que les fibroblastes IMR-90 immortalisés grâce à la transfection de la sous-unité catalytique de la télomérase humaine, hTERT, étaient capables d'entrer en SIPS. D'autre part, une étude de l'expression différentielle chez les fibroblastes IMR-90 hTERT en SIPS sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été réalisée à l'aide du damier à ADN, « Senechips ». Cette étude a permis de mettre en évidence des différences d'expression entre les fibroblastes IMR-90 hTERT en SIPS induite par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par rapport aux cellules non stressées. Enfin, alors qu'une surexpression du TGF- $\beta$ 1 permettait d'expliquer l'apparition de la SIPS chez les cellules IMR-90 normales, celui-ci ne semble pas impliqué dans la SIPS des cellules IMR-90 hTERT. Les résultats obtenus avec le damier à ADN ouvrent des pistes pouvant expliquer cette différence majeure dans l'établissement de la SIPS chez les cellules IMR-90 exprimant la télomérase ou pas.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2003

**Promoteur:** Olivier Toussaint



Voilà 4 ans de passés, ils ont passé à une vitesse incroyable mais m'ont appris beaucoup de choses et m'ont permis de faire de nombreuses connaissances.

4 ans qui se terminent par un mémoire, tâche difficile mais qui a été rendue agréable grâce aux gens qui m'ont entouré et aux joies de la découverte, de l'apprentissage.

Beaucoup de gens sont à remercier et j'espère n'oublier personne. D'abord, merci à vous tous « LES GRAS » de m'avoir accepté au sein de votre équipe et plus particulièrement au professeur Olivier Toussaint qui m'a accueilli dans son équipe. Un grand merci également à Stéph qui a toujours été agréable, gentil et objectif, et qui s'est investi à fond pour moi.

Merci à tous ceux qui un jour où l'autre m'ont rendu mon sourire avec sincérité (Pour J-P : bye, bisous). Pour les discussions durant les folins interminables, et toutes les parties de plaisir.

Merci à toi, Marc d'avoir résolu tous mes problèmes informatiques (comme un Dieu, ah, ah !).

Et comment pourrais-je clôturer cette liste en oubliant tous mes « collègues ». Je vous remercie pour toutes ces années partagées ensemble.

Merci également à tout mes ami(e)s de Namur. Del, Violette, Vl, Alex, Fred, Jerem, Audrey, Matija, Violaine, Vanessa, Caroline, Cindy, Fabien, et beaucoup d'autres encore. Je vous remercie pour tous les bons moments que l'on a passés ensemble (surtout des guindailles mais aussi pour les verres en terrasse qui sont très agréables en votre compagnie).

Mais je tiens encore à remercier plus particulièrement certaines personnes.

Comme toi, Vl, toujours le cœur ouvert, toujours prête à écouter, comprendre, et aider. Je tiens vraiment à te remercier car ta présence

m'était d'une ressource indispensable. Et durant les coups de cœur, les fous rires, tu as toujours été là.

Merci FIK, malgré que durant ces années tu ne m'aies pas toujours rendu la tâche facile, tu as été présent, m'as épaulée, et aidée moralement. Je te remercie du fond du cœur pour toutes ces années d'attentes qui ont été remplies de bonheur.

Merci également à toute ma famille : Maman, Adèle, Papa, Parrain, Myriam (grand merci pour ta compréhension et ton écoute), Eline, Ludo, Mamie, Luc, Vincent et Véro ainsi que les enfants.

Mais, ce mémoire je le dédie à une personne (non, non, je ne t'ai pas oublié) à toi, maman qui a toujours cru en moi, qui m'a encouragée, m'a épaulée, m'a consolée pendant toutes ces années où mon ciel n'a pas été toujours rose. Je t'en remercie du fond du cœur pour tous ce que tu as fait pour moi ces quatre dernières années. Merci.



<b>TABLE DES MATIERES.....</b>	<b>1</b>
<b>A. INTRODUCTION.....</b>	<b>3</b>
1. <i>Première partie : Sénescence répllicative et relations entre stress et vieillissement</i> .....	3
1.1 Sénescence répllicative.....	3
1.2 Relation entre stress et vieillissement.....	3
2. <i>Deuxième partie : Les différents biomarqueurs communs à la sénescence répllicative et à la SIPS</i> .....	4
2.1 Les morphotypes : Modification morphologique associée à la sénescence.....	4
2.2 L'activité $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence.....	4
2.3 Délétions de l'ADN mitochondrial.....	4
2.4 Le raccourcissement des télomères.....	5
2.5 Changement du niveau d'expression de gènes.....	6
2.6 Arrêt du cycle cellulaire en phase G1.....	6
a) Gènes de réponse précoce.....	7
b) Gènes impliqués dans la transition.....	7
c) Cyclines et kinases dépendantes de cyclines.....	7
d) p53, p21 <sup>Waf-1</sup> et pRb.....	7
3. <i>Troisième partie : Le TGF-<math>\beta</math>1 et son implication dans l'apparition de la SIPS</i> .....	8
3.1 Description du TGF- $\beta$ 1 et son récepteur.....	8
3.2 Transduction du signal.....	8
4. <i>Quatrième partie : Expression ectopique de la télomérase en cellules normales</i> .....	9
5. <i>Cinquième partie : Etude de l'expression génique par damier à ADN</i> ....	10
5.1 Microdamiers à haute densité.....	10
5.2 Microdamiers à basse densité.....	10
6. <i>But du mémoire</i> .....	10
<b>B. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</b>	<b>12</b>
1. <i>Culture cellulaire</i> .....	12
2. <i>Stress à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et stimulation au TGF-<math>\beta</math>1</i> .....	12
3. <i>Dosage protéique par la méthode de Lowry</i> .....	13
4. <i>Détection de l'activité S-A <math>\beta</math>-galactosidase</i> .....	14
5. <i>Estimation de la synthèse d'ADN par incorporation de thymidine tritiée</i> .....	14
6. <i>Western Blot</i> .....	15
6.1 Extraction protéique.....	15
6.2 Migration.....	15
6.3 Transfert.....	16
6.4 Blocking et révélation.....	16



7. <i>Real-time RT-PCR</i> .....	17
7.1 Isolation de l'ARN messager .....	17
7.2 Transcription inverse .....	19
7.3 Real-time RT-PCR .....	19
7.4 Analyse des résultats .....	20
8. <i>Microdamier à ADN</i> .....	20
8.1 La rétro-transcription.....	20
8.2 Hybridation.....	21
8.3 Détection des ADN cibles .....	22
C. RESULTATS ET DISCUSSIONS .....	23
1. <i>Première partie : Apparition des biomarqueurs chez les fibroblastes</i>	
IMR-90 hTERT.....	23
1.1 Mise au point des condition de stress.....	23
1.2 L'activité $\beta$ -gal associée à la sénescence .....	24
1.3 Estimation du potentiel prolifératif par mesure de l'incorporation de thymidine tritiée.....	24
1.4 Niveau d'expression de p21 <sup>Waf-1</sup> .....	25
2. <i>Seconde partie : Expression différentielle chez les fibroblastes IMR-90</i>	
hTERT .....	26
2.1 Sénechips.....	26
a) Désign du damier .....	26
b) Utilisation de la sénechips .....	26
1. Effet d'un stresss à l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sur l'expression de gènes chez les cellules IMR-90 hTERT .....	27
2. Effet d'une stimulation au TGF- $\beta$ 1 sur l'expression de gènes chez les cellules IMR-90 hTERT .....	28
2.2 Real-time RT-PCR .....	29
a) Détermination des efficiences de PCR .....	30
b) Quantification du taux de transcrits des gènes d'intérêt dans les différentes conditions testées .....	30
D. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	31
E. BIBLIOGRAPHIE .....	34



---

°C	degrès celsius
μ	micro
A	Adénine
AB	antibiotique
Ac	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNmt	Acide désoxyribonucléique mitochondrial
Apo J	Apolipoprotéine J
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine tri phosphate
BSA	serum albumine bovine
c	Centi
C	Cytosine
CDK	Cycline dépendante kinase
c <sub>i</sub>	curri
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
Ct	Cycle seuil
D.O.	Densité optique
DCP	Doublement cumulatif de population
dNTP	Déoxynucléotide
DTT	Dithiotréitol
EtOH	Ethanol
FBS	Sérum de veau fœtal
FHD	Fibroblastes humain diploïdes
Fig	Figure
g	gramme
G	Guanine
h	heures
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
kb	kilo paire de base
l	litre
m	milli
M	molaire
m	mètre
MAPK	mitogen-activated protéine kinase
MEC	Matrice extracellulaire
MEM	Modified Eagle medium
MF	Morphotypes
min	minute
n	nano
N	normal
Oligo dT	oligonucléotide contenant une répétition de T
pb	Paire de base
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymérase chain reaction

---

PRb	Protéine du rétinoblastome
PVDF	Polyvinylidène difluorure
RL	radicaux libres
RNAse	Ribonucléase
RNAsin	Inhibiteur de ribonucléase
rpm	tour par minute
RT-PCR	Reverse transcriptase-polymérase chain reaction
S-A $\beta$ -gal	Activité $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
sec	seconde
SIPS	Sénescence induite prématurément par les stress
T	Thymidine
T25	Boîte de culture de 25 cm <sup>2</sup>
T75	boîte de culture de 75 cm <sup>2</sup>
t-BHP	ter butyl hydroperoxyde
TBS	Tris buffer saline
TBS-T	Tris buffer saline-tween
TCA	Acide trichloroacétique
TGF- $\beta$ 1	Transforming Growth Factor $\beta$ 1
Tm	Température de melting
U	unité enzymatique
UV	Ultraviolet
V	volt
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-d-galactopyranoside

# **INTRODUCTION**



## Première partie : Sénescence répllicative et relations entre stress et vieillissement

### 1. Sénescence répllicative

En 1961, Hayflick et Moorhead montrèrent qu'une population de fibroblastes de poumon fœtal humain mis en culture avait une capacité proliférative limitée à environ 50 passages en culture. En effet, les cellules qui ont atteint la limite de leur potentiel prolifératif, arrêtent de se diviser de manière irréversible tout en restant métaboliquement actives. Ce phénomène est appelé «sénescence répllicative». Les cellules sénescents restent viables durant de longues périodes allant jusqu'à 1 an et finissent par mourir par nécrose (Toussaint, *et al.*, 2002).

De plus, Hayflick et Moorhead établirent un modèle illustrant l'évolution d'une culture cellulaire *in vitro* (Hayflick, *et al.*, 1961). Celle-ci présente trois phases bien distinctes (Fig I-1) :

La phase I correspond à la mise en culture des cellules à partir du tissu d'origine. La phase II est une phase de croissance exponentielle durant laquelle les cellules se divisent activement. La phase III, quant à elle, se caractérise par un déclin lent et progressif de la vitesse de croissance menant ensuite à un arrêt irréversible des mitoses.

Ce modèle a été, par après, généralisé à de nombreux types cellulaires prolifératifs ainsi qu'à de nombreuses espèces animales.

La sénescence des cellules prolifératives observée *in vitro* est à mettre en relation avec le vieillissement cellulaire *in vivo*. Des études effectuées par l'équipe de Martin nous apprirent que le nombre maximum de passages en culture diminuait lorsque l'âge de l'individu donneur augmentait (Martin, *et al.*, 1970)(Cristofalo, *et al.*, 1998). Ce qui nous amène à dire que les cellules âgées entrent plus vite en sénescence répllicative. On a également montré que les cellules provenant d'une espèce à longue durée de vie atteignaient moins vite le stade de sénescence (Hayflick, 1977).

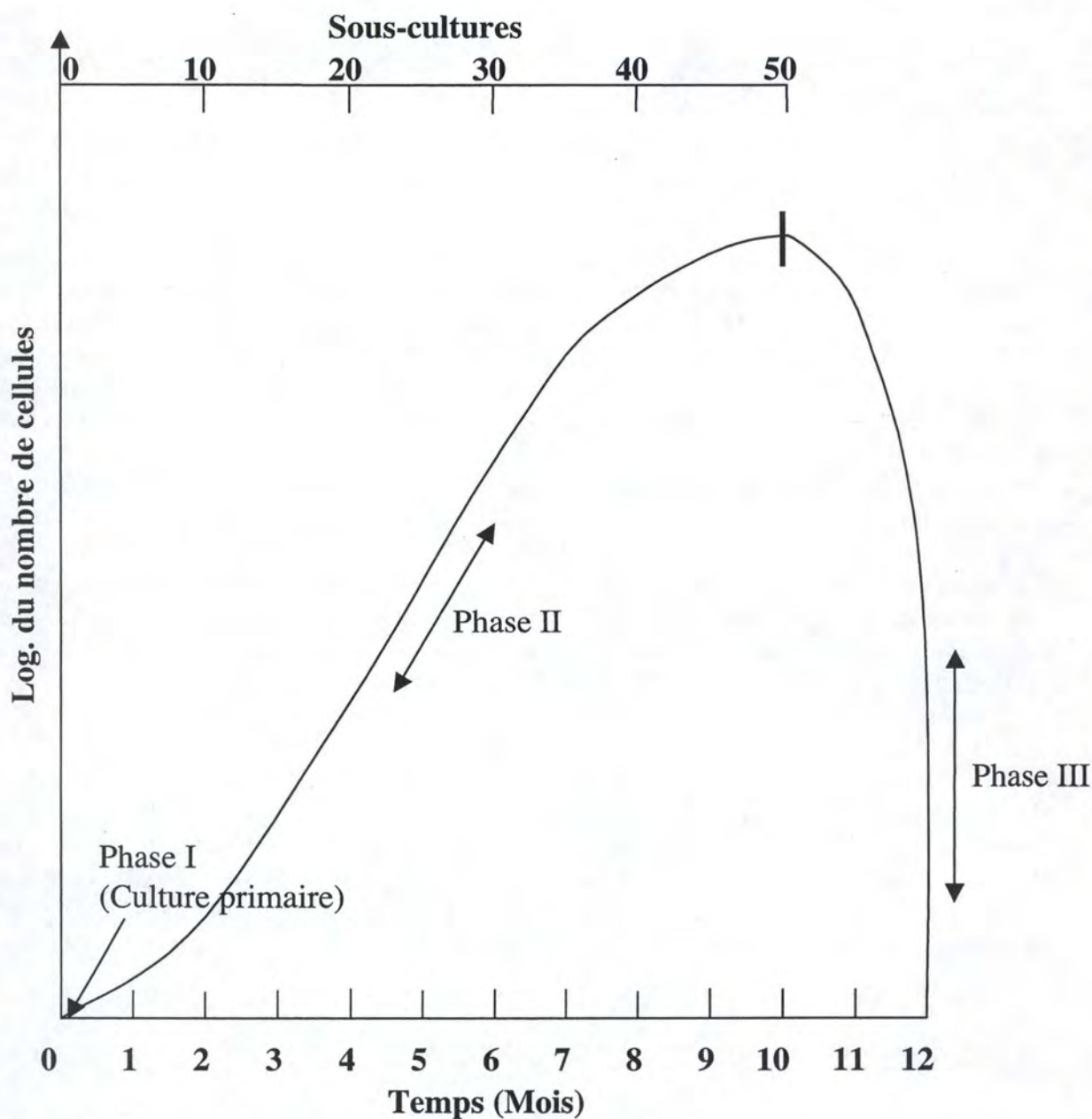
### 2. Relation entre stress et vieillissement

Un stress peut être défini comme toute perturbation défavorable d'un facteur environnemental auquel un système vivant est exposé. Les cellules sont soumises à une multitude de stress qui peuvent être très variés (stress thermiques, stress oxydatifs,...).

Lorsque l'on soumet des cellules jeunes à des stress oxydatifs subcytotoxiques avec du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), du *tert*-butylhydroperoxyde (*t*-BHP) ou encore des ultraviolets, on observe l'apparition de caractéristiques de la sénescence répllicative 3 jours seulement après le stress. Ce vieillissement accéléré des cellules soumises à des stress subcytotoxiques est appelé : sénescence induite prématurément par des stress (SIPS) (Pour revue : Toussaint *et al.*, 2002b).

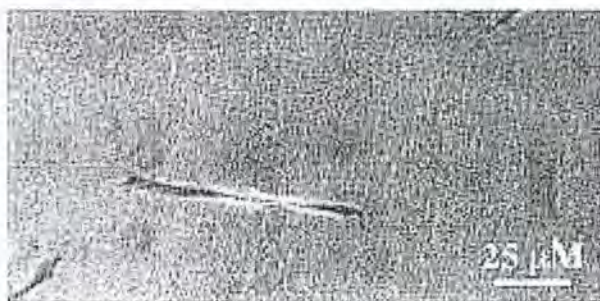
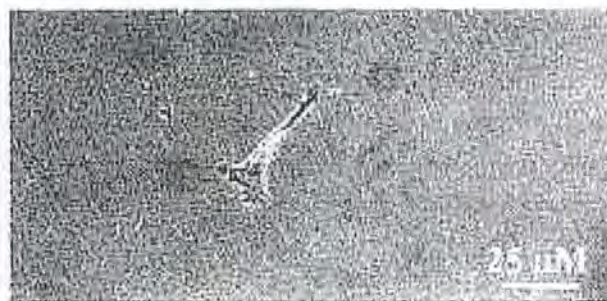
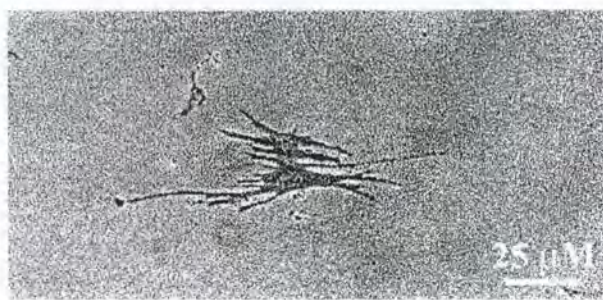
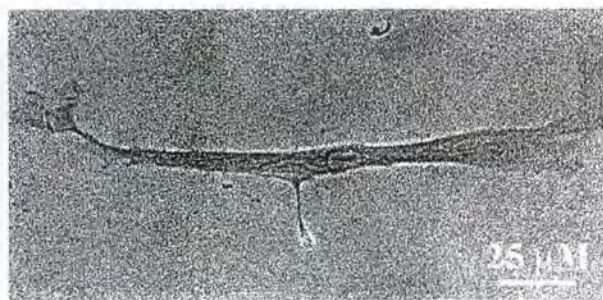
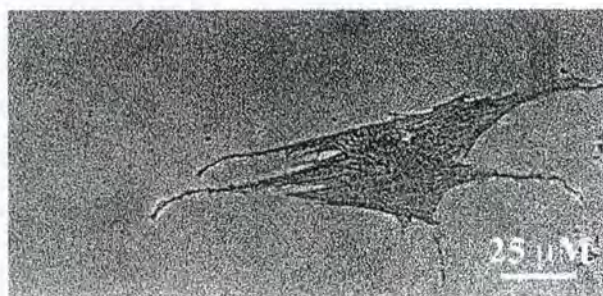
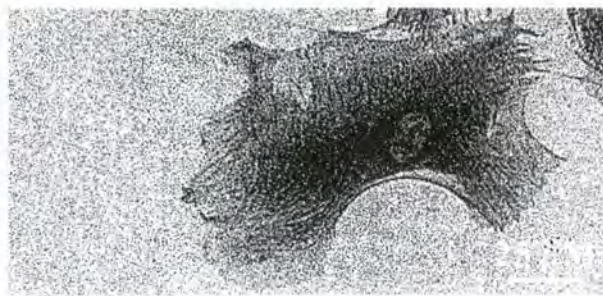
Parmi les stress qui ont été cités, nous nous attarderons principalement au stress oxydatif sous peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).



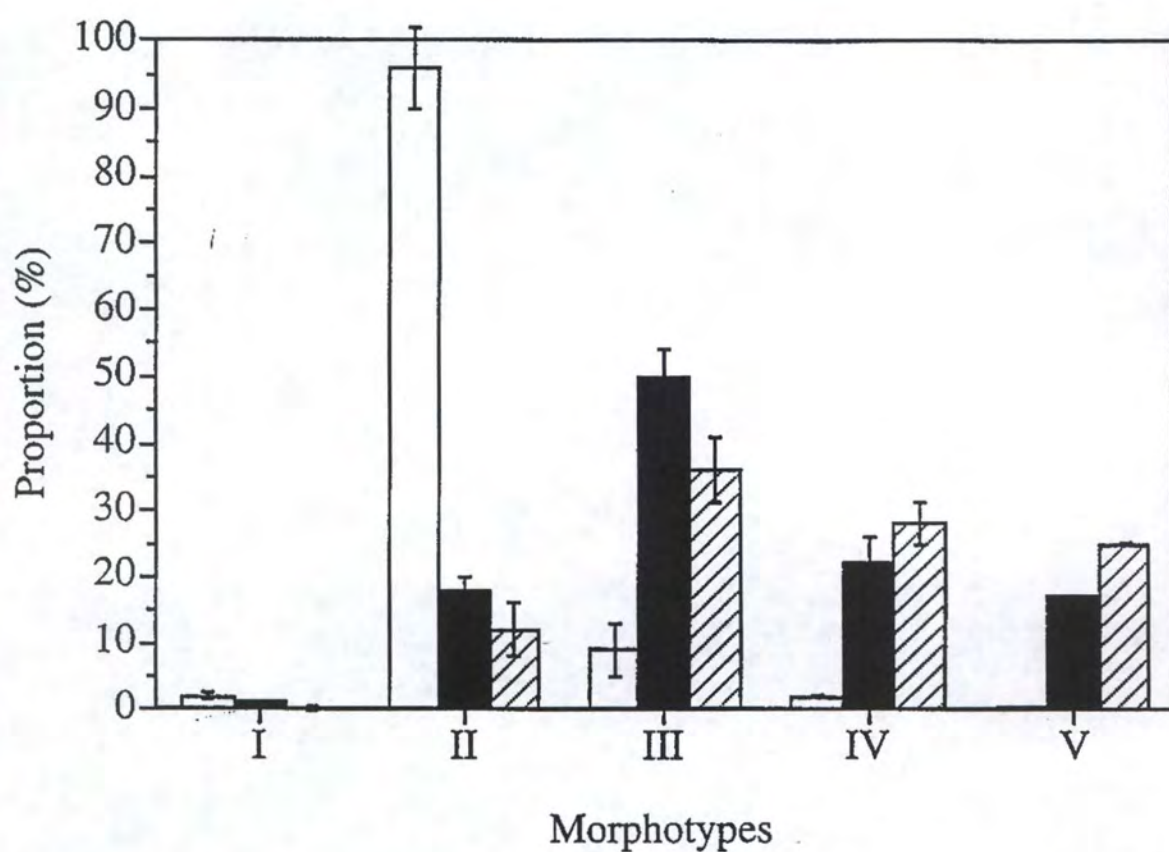


**Figure I.1 :** Diagramme montrant les trois phases successives de la vie d'une culture de fibroblastes normaux (Hayflick, 1977). La phase I se caractérise par la mise en culture d'un explant et l'établissement d'une culture primaire. La phase II débute dès le premier repiquage et se caractérise par un taux de croissance exponentiel. Un ralentissement du rythme de croissance survient ensuite, suivi par un arrêt définitif des divisions cellulaires. Cet état, appelé sénescence répliquative, se termine, après une période plus ou moins longue, par la mort des cellules (Phase III).



**MF I****MF II****MF III****PMF IV****PMF V****PMF VI**

**Figure I.2 :** Représentation des différents morphotypes observés dans les cultures de fibroblastes humains WI-38. Les fibroblastes humains évoluent au cours de leur vieillissement à travers une séquence de 7 morphotypes. Les trois premiers sont des morphotypes mitotiques (MF I, MF II, MF III) et les 4 suivants sont des morphotypes post-mitotiques (PMF IV, PMF V, PMF VI, PMF VII). Le morphotype PMF VII représente les cellules nécrotiques, il est rarement observé en culture.



**Figure I.3 :** Proportions des différents morphotypes observés dans des cultures de fibroblastes WI-38 jeunes ( 27 DCP ) représentés par les colonnes blanches, âgés ( 43 DCP ) représentés par les colonnes noires, et de fibroblastes jeunes deux jours après avoir subi 5 stress successifs de 1h en présence de t-BHP 100  $\mu$ M, illustrés par les colonnes hachurées (Toussaint, O. *et al.*, 1992).



## Deuxième partie : Les différents biomarqueurs communs à la sénescence répllicative et à la SIPS

### 1. Les morphotypes : Modification morphologique associée à la sénescence

L'équipe de Bayreuther a montré qu'il est possible de classer les fibroblastes humains en 7 classes morphologiques bien distinctes au cours de leurs différents passages en culture. Ces différentes morphologies ont été appelées « morphotypes ». Le passage d'une morphologie à l'autre est graduel. Ces différentes morphologies se distinguent par la forme et la taille, et par le rapport entre la surface du noyau et celle du cytoplasme.

Ces 7 morphologies ont été classées en 3 catégories : (Fig I-2)

Les morphotypes mitotiques (MF I, II et III) sont caractérisés par leurs petites tailles et leur capacité de se diviser activement. On les retrouve en quantité abondante dans les cultures jeunes. Les morphotypes postmitotiques (MF IV, V et VI) apparaissent progressivement au fil des passages en culture. Ces morphotypes sont de grandes tailles. Enfin, le morphotype VII correspond aux cellules nécrotiques, en dégénérescence.

La proportion des différents morphotypes varie avec le nombre de passage en culture. En effet, dans une culture de fibroblastes humains de poumons fœtal WI-38, on remarque que le MF I ne représente plus que 10% du total des cellules au quinzième passage en culture alors que la proportion de MF II est encore de 90%. Plus tard, on observe une diminution des MFII au profit des MF III. Après un grand nombre de passage en culture, les morphotypes post-mitotiques apparaissent (Fig I-3). D'autre part, cette évolution vers les morphotypes post-mitotiques dépend de la concentration en molécule stressante ainsi que la durée et du nombre de stress (Toussaint *et al.*, 1992).

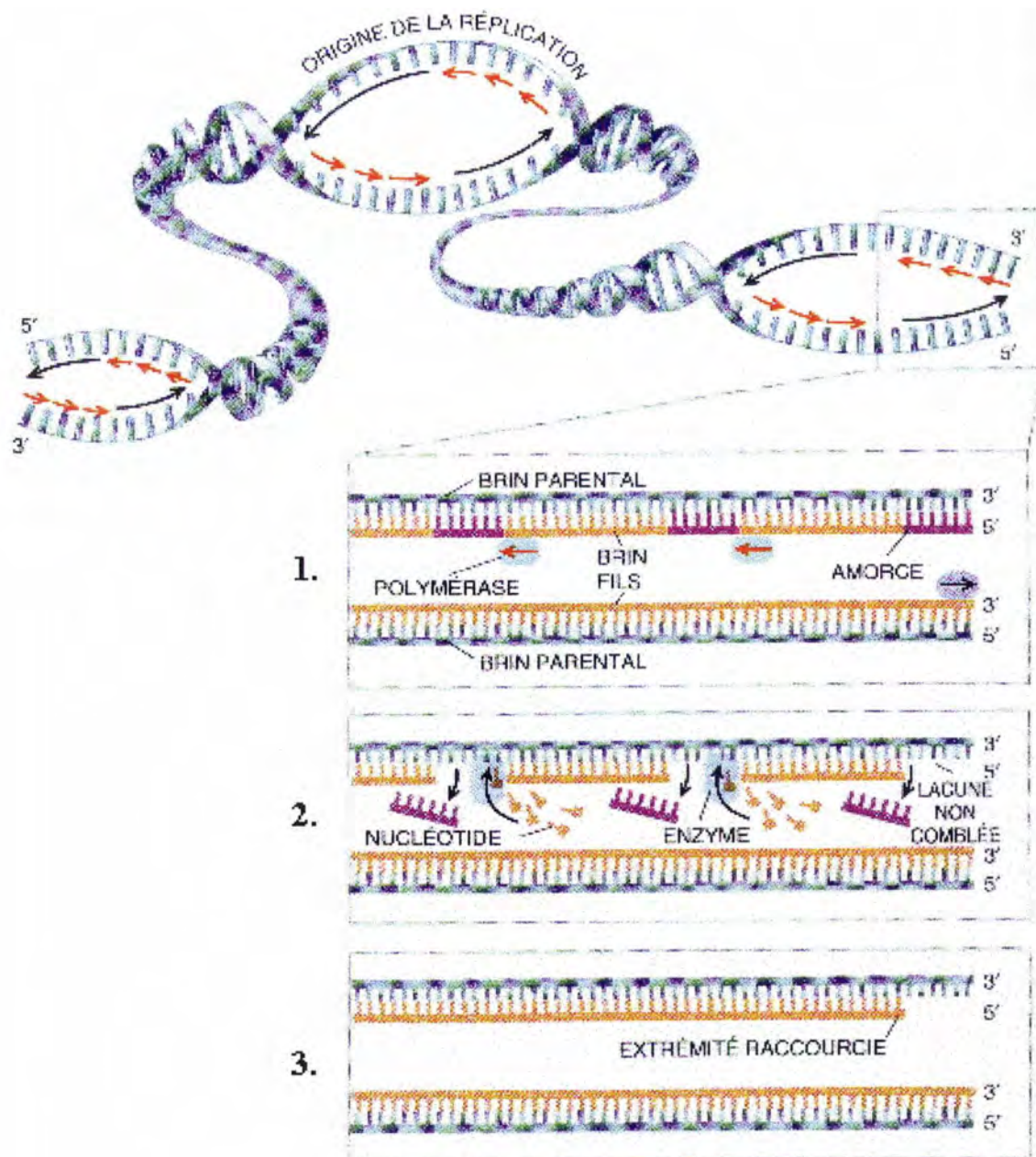
### 2. L'activité $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence.

L'équipe de Dimri a mis en évidence chez les cellules sénescents, c'est-à-dire n'étant plus capable de se diviser, une activité enzymatique  $\beta$ -galactosidase qui leur est propre et pour cette raison nommée « Senescence-Associated  $\beta$ -galactosidase Activity » (S-A  $\beta$ -gal) (Dimri, *et al.*, 1995). La  $\beta$ -galactosidase est une hydrolase lysosomiale normalement active à pH 4. La S-A  $\beta$ -gal a, quant à elle, une activité détectable à pH 6. En effet, mises en présence du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-galactopyranosine (X-gal), un substrat de la  $\beta$ -galactosidase, les cellules sénescents se colorent en bleu à pH 6. Actuellement, on ne sait toujours pas pourquoi une activité  $\beta$ -gal est observée à pH 6 dans les cellules sénescents. Cependant de nouvelles découvertes suggèrent que la S-A  $\beta$ -gal serait due à l'augmentation de la taille des lysosomes et à une accumulation de l'enzyme (Remacle, *et al.*, 1980).

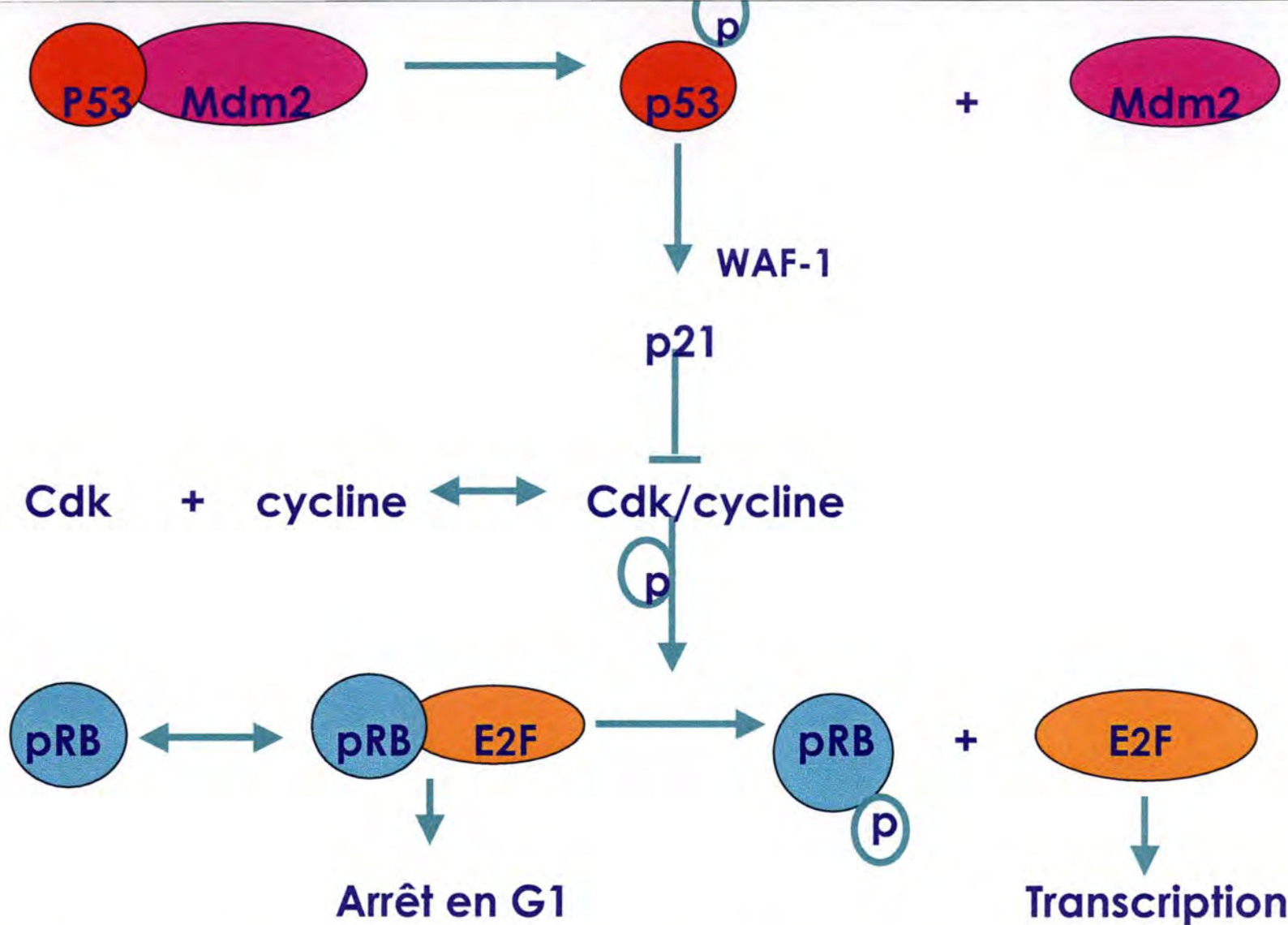
Cette activité représente donc un biomarqueur remarquable pour la détection des cellules sénescents dans une culture *in vitro*. On remarque que la proportion de cellules possédant l'activité S-A  $\beta$ -galactosidase augmente au cours des passages en culture, atteignant plus de 80 % de cellules positives chez les cellules sénescents. Cette augmentation est également observée 72h après le stress lors l'exposition des fibroblastes humains à un stress à l' $H_2O_2$  pendant 2 h (Frippiat, *et al.*, 2001).

### 3. Délétions de l'ADN mitochondrial



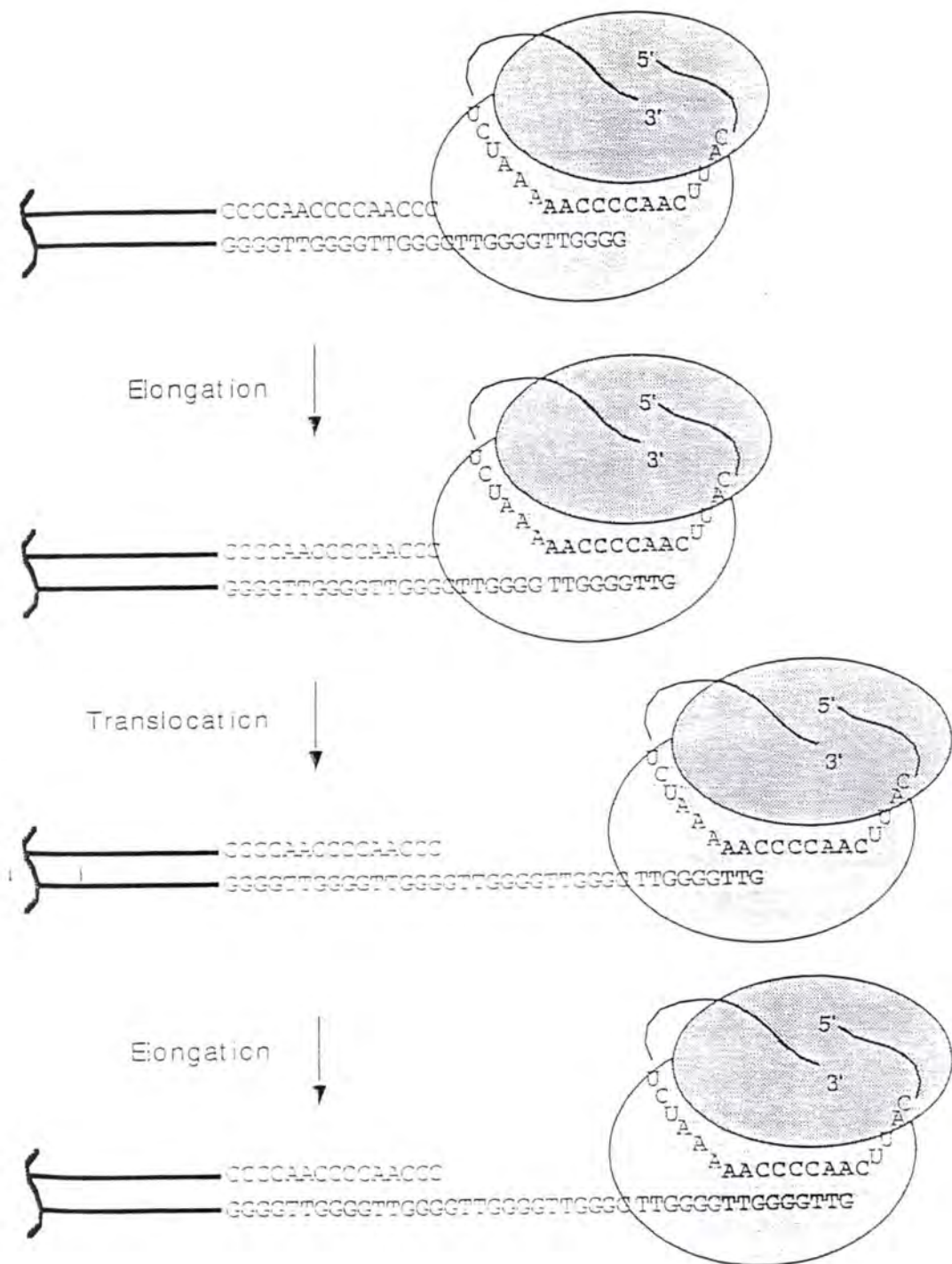


**FigureI-4 :** La réplication se fait de manière discontinue sur un des brins. Un fragment d'ARN (mauve) sert d'amorce à la polymérase. Une fois le fragment polymériser, le fragment d'Okazaki ayant servi d'amorce est dégradé par une enzyme (bleu) et remplacé par un fragment d'ADN. Mais ce remplacement du fragment d'ARN ne se fait pas à l'extrémité du brin. A la fin de la réplication, on obtient donc un bout protrudant et un bout plus court.



**Figure I-5 :** Suite à un dommage à l'ADN, c-abl est activé et permet la libération et l'activation de p53. p53 activé peut à son tour activer p21<sup>Waf-1</sup>. p21<sup>Waf-1</sup> étant un inhibiteur de kinase dépendante de cyclines (CKI), elle empêche la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (pRb) par les kinases dépendante de cyclines (CDK). pRb est donc lié à un facteur de transcription E2F qui ne peut dès lors exercer sa fonction de facteur de transcription et bloque donc le cycle cellulaire en phase G1.





**Figure I-6 :** La télomérase reconnaît les télomères et les allonge. Elle s'y attache et polymérise des nucléotides sur base d'une matrice d'ARN. Ensuite, elle glisse sur le brin néosynthétisé et se rattache à son extrémité et polymérise à nouveau des nucléotides.



Les cellules, pour l'ensemble de leurs fonctions, ont besoin d'énergie. Cette énergie est principalement fournie par les mitochondries sous forme d'ATP (Rawn *et al.*, 1990). Ces organites possèdent leur propre génome, circulaire de 16569 bp. Celui-ci code pour une partie des protéines impliquées dans la production d'ATP.

Plusieurs mutations ponctuelles et délétions ont été détectées dans l'ADN mitochondrial au cours du vieillissement cellulaire. Les délétions sont souvent de grande taille (jusqu'à 10,4 kb) et portent sur des gènes essentiels au métabolisme énergétique. La plus commune étant une délétion de 4.97 Kb. Des études réalisées sur différents échantillons de tissus humains ont montré que l'accumulation des délétions est plus importante dans les tissus actifs qui consomment plus d'oxygène, et qui génèrent donc plus de radicaux libres (Dumont *et al.*, 2000). D'autre part, au laboratoire, nous avons mis en évidence que les délétions sont également observées chez des cellules entrées en SIPS suite à des stress au *t*-BHP (Dumont *et al.*, 2000) et UVB (Chainiaux *et al.*, en préparation).

#### 4. Le raccourcissement des télomères

Les télomères sont les parties non codantes du génome nucléaire situées aux extrémités des chromosomes et constituées de la répétition d'une courte séquence consensus (TTAGGG : chez l'homme) (Meyne *et al.*, 1989). Ils sont essentiels au maintien de la stabilité chromosomique : ils empêchent la fusion entre les chromosomes (Hemann *et al.*, 2001). À la naissance, ils ont une longueur de 10 à 15 Kb, qui diminue au cours des divisions cellulaires chez les cellules somatiques humaines. Cette perte se chiffre aux environs de 50 à 150 pb par passage en culture *in vitro* et de 15 à 50 pb par an *in vivo*. Ce raccourcissement est expliqué par le « problème de réplication terminale ». Durant la réplication de l'ADN un des deux brins est synthétisé de façon discontinue. Des fragments d'Okazaki (ARN) sont hybridés au brin matrice. Ils servent d'amorce à la polymérase. Une fois que le morceau d'ADN a été répliqué, les fragments d'Okazaki sont détruits et remplacés par de l'ADN. Ce remplacement des fragments d'Okazaki ne se fait pas à l'extrémité et laisse donc un fragment d'ADN protrudant et un autre fragment plus court qui par après servira de modèle pour la réplication (Fig I-4).

La théorie télomérique du vieillissement représente les télomères comme une horloge interne calculant le nombre de mitoses effectuées au cours du temps. Selon elle, la cellule deviendrait sénescence lorsqu'un télomère atteint une longueur critique. D'un point de vue moléculaire, on ne connaît toujours pas le mécanisme qui induit le blocage des divisions cellulaires, toutefois une hypothèse principale a été proposée afin d'expliquer cette perte de capacité proliférative. Ce raccourcissement des télomères serait perçu comme un dommage à l'ADN ce qui entrerait l'activation de c-Abl. c-Abl induirait la transcription de p53 (Facteur de Transcription) qui lui-même activerait la transcription de p21<sup>Waf-1</sup> et amènerait à un arrêt du cycle cellulaire (Fig I-5)(Saretzki, *et al.*, 1999).

Ce raccourcissement des télomères n'est pas observé chez les cellules germinales et les cellules immortelles, comme les cellules cancéreuses (Greider *et al.*, 1996). Celles-ci sont munies d'une activité télomérase qui, grâce à sa sous-unité catalytique est capable de polymériser des nucléotides sur une matrice d'ARN et de maintenir une taille constante des télomères ou de les allonger fortement. D'autre part, de récents travaux réalisés par l'équipe de Bodnar montrent qu'il est possible d'augmenter le nombre de passage en culture des fibroblastes humains à condition de les transfecter par un vecteur comportant l'ADN complémentaire codant pour la sous-unité catalytique de la télomérase (Bodnar, *et al.*, 1998)(Fig I-6).



## 5. Changement du niveau d'expression de gènes

Plus de 80 gènes voient leur niveau d'expression varier lors de la sénescence répliquative des fibroblastes humains cellulaires. Ces gènes sont très divers et codent pour des facteurs de croissance, des inhibiteurs de croissance, des récepteurs, des composants de la matrice extracellulaire, des régulateurs du cycle cellulaire, etc. (Pour revue : Cristofalo, 1998). Parmi ces gènes, on retrouve la fibronectine et  $\alpha$ -1 procollagène qui sont des composants de la matrice extracellulaire (MEC) et qui sont impliqués dans l'adhésion cellulaire, dans l'organisation du cytosquelette, dans la migration, dans la croissance cellulaire et dans la différenciation. La fibronectine est également impliquée dans le changement de morphologie. L'ostéonectine intervient dans le remodelage des tissus en induisant l'expression de métalloprotéases (collagénase, gelatinase). Ces métalloprotéases dégradent la MEC et les membranes basales. L'ostéonectine inhibe l'entrée en phase S en se fixant soit à la MEC soit au PDGF (Platelet Derived Growth Factor) et par cela, empêche la reconnaissance de son récepteur spécifique.

L'apolipoprotéine J (apo J) est aussi un gène dont le niveau d'expression est modifié à la hausse dans les cellules sénescents. La surexpression de l'Apo J entraînait une protection contre une multitude de stress. Elle aurait une fonction de « chaperone ». Elle lie le facteur de transcription HSF 1 (Heat Shock Factor) et empêche l'altération radicalaire des protéines (Michel, *et al.*, 1997).

Le gène SM22 (Smooth muscle 22) trouve son expression également altérée dans les cellules soumises à un stress.

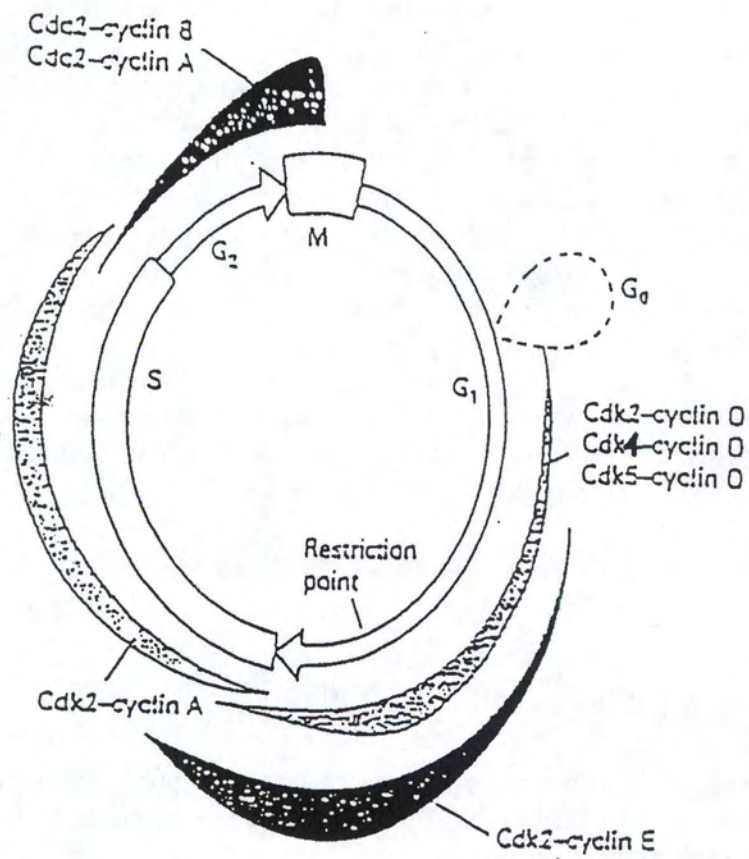
## 6. Arrêt du cycle cellulaire en phase G1

Le cycle cellulaire est divisé en 4 phases. La première phase est la phase G1 où la cellule récupère après s'être divisée. Elle est suivie de la phase S durant laquelle les cellules dupliquent leur ADN. Vient ensuite la phase G2 qui permet la fabrication des protéines nécessaires à la division. Après ces différentes phases, la cellule entre en mitose : c'est la phase M. A la fin de la phase G1, se présente le point de restriction. Il permet à la cellule de contrôler son état avant d'entamer la duplication de son ADN et de poursuivre par sa division. Si elle passe ce point, elle continuera son cycle quoi qu'il se passe. Après le passage au point de restriction, les cellules ne répondent plus aux signaux inhibiteurs et n'ont plus besoin de signaux stimulateurs pour entrer en phase S (Pardee, *et al.*, 1974).

Le cycle cellulaire est étroitement régulé par les CDK (kinase dépendante de cycline). Ces kinases sont actives quand elles sont liées à une cycline. Ces complexes CDK/cyclines sont exprimés et activés différemment selon la phase du cycle dans laquelle la cellule se trouve. Les complexes cycline D-CDK4, 6 sont activés en premier en G1 en réponse à des stimuli mitogènes et restent actifs jusqu'à l'entrée en phase S. Les complexes cycline E-CDK2 sont activés en fin de phase G1 et restent actifs jusqu'à la fin de la phase S. Les complexes cycline A-CDK2 deviennent actifs en phase S et sont toujours présents jusqu'à la moitié de la phase G2 (Figure I-7).

Une des caractéristiques majeures de la cellule sénescence est qu'elle est incapable de se diviser. C'est au niveau de la transition entre la phase G1 et S du cycle cellulaire qu'un blocage apparaît. On peut classer les gènes impliqués dans cycle cellulaire et qui voient leur expression varier en 4 catégories :



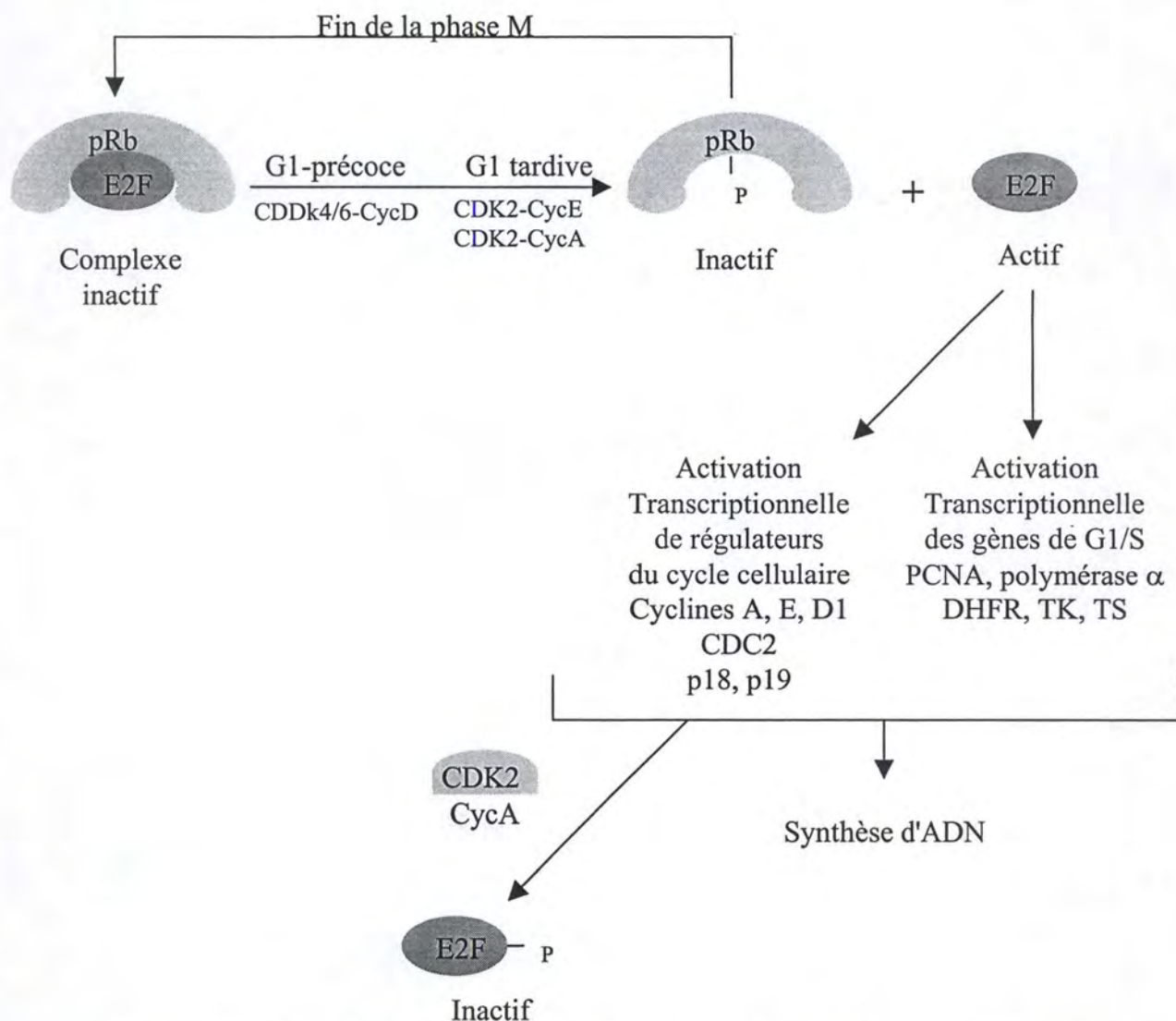


**Figure I.7:** Représentation schématique de l'intervention des différents complexes cycline / CDKs au cours du cycle cellulaire.



CDK	Poids moléculaire (kDa)	Sous-unité régulatrice	Inhibiteur	Fonctions cellulaires principales
CDK1	34	Cycline B Cycline A	p21 <sup>Waf-1</sup> p27 <sup>kip-1</sup>	Déclenchement de la mitose
CDK2	33	Cycline A  Cycline E	p21 <sup>Waf-1</sup>  p27 <sup>kip-1</sup>	Régulation de la réplication de l'ADN (via pRb?) Phosphorylation de pRb
CDK3	36	?		Régulation de la phase G <sub>1</sub>
CDK4	34	Cycline D	p21 <sup>Waf-1</sup> , p27 <sup>kip-1</sup> p15 <sup>INK-5B</sup> <sub>4A</sub> , p16 <sup>INK-2</sup>	Phosphorylation de pRb
CDK5	35	Cycline D?	p21 <sup>Waf-1</sup>	Participation au métabolisme
CDK6	40	Cycline D	p15 <sup>INK-5B</sup> <sub>4A</sub> , p16 <sup>INK-2</sup> p18 <sup>INK-4C</sup>	Phosphorylation de pRb
CDK7	42	Cycline H	?	Activation des autres kinases

**Figure I-7:** Propriétés des principales CDKs et leurs rôles cellulaires (d'après Wolowiec, D. and French, M., 1996).



**Figure I.8 :** Rôle de pRb dans la régulation du cycle cellulaire. La phosphorylation de pRb dès la phase G1 est assurée par différents complexes cyclines-CDK et conduit à la libération du facteur de transcription E2F. Dès lors actif, E2F active la transcription de nombreux gènes dont les produits sont impliqués dans la réplication de l'ADN ou la régulation du cycle cellulaire. E2F active, entre autres, la synthèse de la cycline A. Le complexe CDK2-CycA, actif en phase S, inactive E2F par phosphorylation.



- **Gènes de réponse précoce**

Les gènes de réponse précoce sont normalement induits suite à une stimulation par des mitogènes. Ils permettent la transcription de gènes tels que les cyclines, les CDK,... . Chez les cellules non sénescents, les mitogènes activent par transduction du signal l'expression du gène *c-myc*. C-Myc est chargé d'activer SRF (serum response factor) qui va ensuite se lier au site consensus SRE (serum response element) du promoteur de *c-fos* dont la transcription est déclenchée. *c-fos* peut dès lors dimériser avec *c-jun* et former le facteur de transcription AP-1 qui permet la transcription de gènes essentiels pour le passage de la phase G1 en phase S. Lors de la sénescence, SRF est hyperphosphorylé ce qui empêche sa liaison à la séquence SRE et par conséquent la transcription de *c-fos*. Le facteur de transcription AP-1 n'est plus actif et ne peut induire la transcription de ces gènes cibles.

- **Gènes impliqués dans la transition G1/S**

Une répression des gènes induits en fin de phase G1 et/ou à la limite entre G1 et S a également été observée. Cette répression est induite par la déficience en E2F qui est un régulateur important de l'expression de gènes nécessaires pour la phase S. Ces gènes codent pour des protéines nécessaires à la duplication de l'ADN (thymidine kinase, ribonucléotide réductase,...). Cette déficience en E2F est due au taux élevé de protéine du rétinoblastome (pRb) hypophosphorylé qui interagit avec E2F et permet sa dégradation. La phosphorylation de pRb est régulée par des CDK. Dans les cellules sénescents, la phosphorylation de pRb ne se fait plus et donc E2F reste inactif (Fig 1-8).

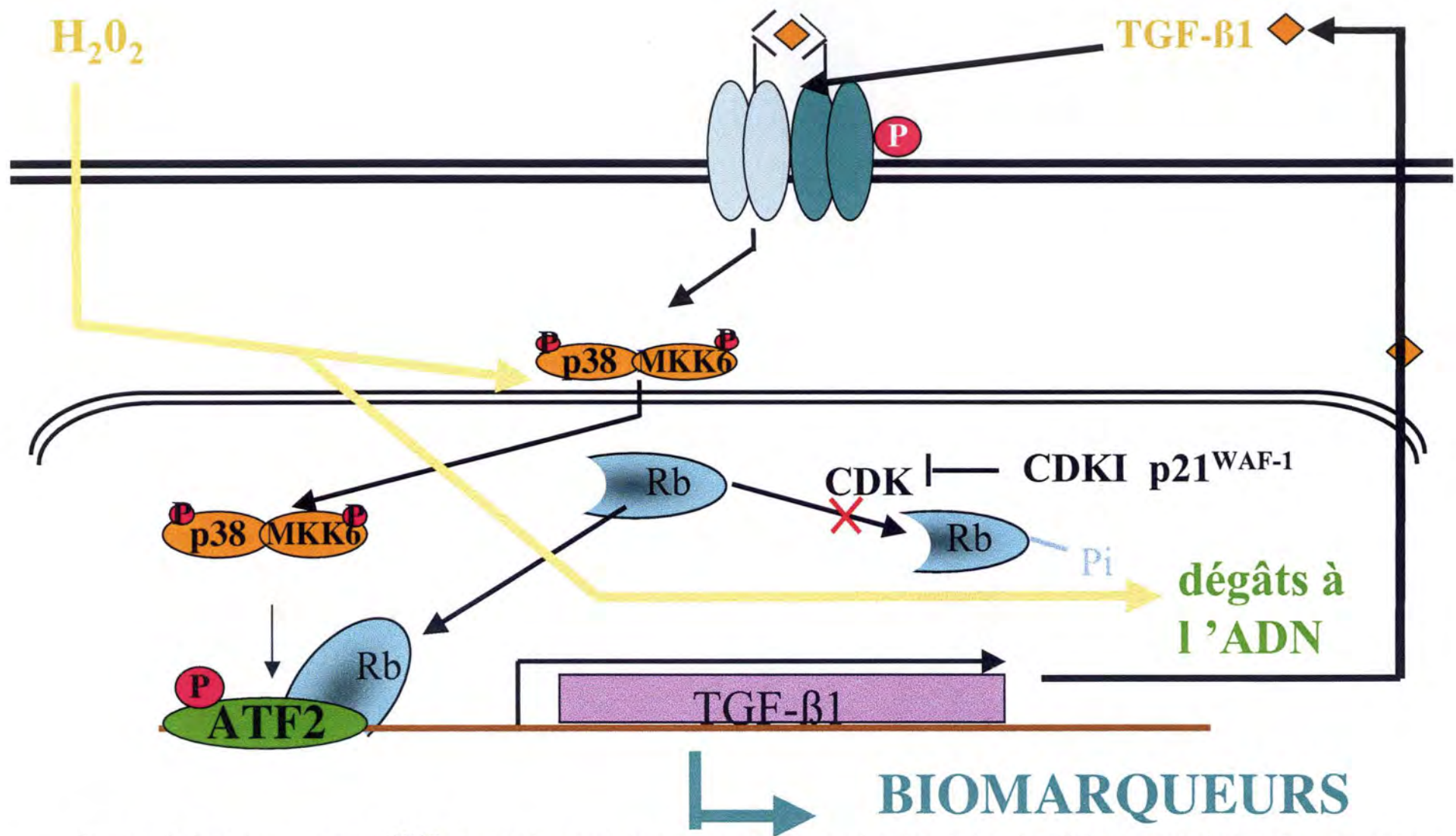
- **Cyclines et kinases dépendantes de cyclines**

Plusieurs cyclines et CDK nécessaires à la progression en G1 et G2 voient leur expression diminuer au cours du temps. On assiste ainsi à l'arrêt transcriptionnel dans les fibroblastes âgés, de *cdk2*, *cycline A* et *B*, mais également à la perte d'activité enzymatique des complexes cycline-CDK dont la cycline E-CDK et la cycline D-CDK.

- **p53, p21<sup>Waf-1</sup> et pRb**

Pour commencer, nous parlerons de la protéine p53. Celle-ci joue deux rôles : celui de « tumor suppressor », et celui de facteur de transcription. Dans les cellules normales, p53 est présent en faible quantité car MDM2, induit en fin de phase G1, s'y lie et provoque l'exportation de p53 du noyau vers le cytoplasme ainsi que sa dégradation par les protéasomes (Ryan *et al.*, 2001). Par contre, dans les cellules sénescents comme chez les cellules entrées en SIPS, MDM2 n'est plus induit en présence de mitogènes et p53 peut dès lors jouer son rôle de « tumor suppressor » (Chen, *et al.*, 2003). En effet, p53 actif se lie à sa séquence consensus dans le promoteur de certains gènes nécessaires à la progression du cycle. Ceci empêche la liaison des facteurs de transcription à ces gènes, résultant en la suppression de leur transcription. D'autre part, p53 exprime son rôle de facteur de transcription en se fixant sur le promoteur de p21<sup>Waf-1</sup> et en induisant sa transcription.

Interéssons-nous, ensuite, à la surexpression de p21<sup>Waf-1</sup>. p21<sup>Waf-1</sup> est un CDKI (inhibiteur de kinases dépendantes de cyclines). Les CDKI peuvent être classés en 2 familles : La première famille est celle des INK 4 dont les membres sont p15<sup>INK-4d</sup>, p16<sup>INK-4a</sup> et p19<sup>INK-4b</sup>. Ils se lient au CDK 4 et 6 et exercent leur action inhibitrice de 2 façons. Soit en empêchant le complexe cycline/CDK de se former, soit en empêchant l'interaction complexe-substrat. La seconde famille, Waf1/KIP1, est constituée des protéines p21<sup>Waf-1</sup>, p27<sup>KIP-1</sup> et p57<sup>KIP-2</sup>.



**Figure I-9:** Suite à un stress, p38<sup>MAPK</sup> est activé et passe dans le noyau où il y a phosphorylation de ATF2 qui est un facteur de transcription. ATF2 reconnaît le promoteur de TGF-β1 qui est alors transcrit et traduit. Celui-ci après être libéré dans le milieu extracellulaire est reconnu par son récepteur et cela entraîne une deuxième vague d'activation de p38<sup>MAPK</sup> et une réactivation de ATF2 ce qui permet l'apparition des biomarqueurs. D'autre part, suite un stress, des dégâts à l'ADN apparaissent. Ces dommages activent c-Abl qui active p53 ce qui amène la transcription de p21<sup>Waf-1</sup> (CDKI). Il n'y a plus de phosphorylation de pRb car les CDK2, 4, 8 sont inhibées. Tout cela, conduit à un arrêt du cycle cellulaire.



Leur expression est dépendante d'évènements tels que les dommages à l'ADN, l'inhibition de contact, l'absence de facteurs de croissance.  $p21^{Waf-1}$  dont la quantité augmente dans les cellules sénescents et en SIPS, s'associe aux complexes CDK2/cycline D ou E et inhibe l'activité kinasique des CDK. Une des conséquences de cette inhibition est l'hypophosphorylation de pRb.

Dans les cellules jeunes, pRb est hyperphosphorylée suite à l'action de certains complexes cycline/CDK. Sous cette forme, pRb est incapable d'inhiber le facteur de transcription E<sub>2</sub>F. On assiste à la transcription de gènes nécessaires à la phase S et donc à la progression du cycle. Par contre, lorsque pRb est hypophosphorylé, les cellules ne sont plus capables de réaliser la phase S du cycle cellulaire.

En résumé, les causes immédiates permettant d'expliquer l'arrêt des capacités de prolifération chez des cellules sénescents et en SIPS sont d'une part la sous-expression ou l'inactivation d'effecteurs positifs et d'autre part une sur-expression d'inhibiteurs du cycle cellulaire.

## Troisième partie : Le TGF- $\beta$ 1 et son implication dans l'apparition de la SIPS

### 1. Description du TGF- $\beta$ 1 et son récepteur

Le TGF- $\beta$ 1 fait partie de la superfamille des TGF (transforming growth factor) qui contrôle une grande variété de processus cellulaires tels que la croissance cellulaire, la différenciation, l'adhésion, la morphogenèse tissulaire, l'expression de gènes et ce, dans une variété d'organismes. Le TGF- $\beta$ 1 transmet son signal via son récepteur se trouvant en membrane plasmique. Il est hétérodimérique. Ses récepteurs Serine/Thréonine kinases sont au nombre de trois. Le récepteur I (RI) peut s'associer au récepteur II et III. Le TGF- $\beta$ 1 n'est reconnu que par le récepteur II qui reconnaît aussi le TGF- $\beta$ 2. Par contre, le RIII ne reconnaît que le TGF- $\beta$ 3.

### 2. Transduction du signal

Nous avons montré que suite à un stress avec de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> appliqué sur des fibroblastes IMR-90, il y a phosphorylation de  $p38^{MAPK}$  via l'activation d'une protéine activatrice de  $p38^{MAPK}$ , la MKK6 ou 3.  $p38^{MAPK}$  est une MAPKinase (Mitogen-Activated Protein Kinases). Les MAPK sont activées par des stress et des facteurs de croissance en fonction du type cellulaire, du type de stress ou des conditions physiopathologiques. Initialement, la voie des MAPK était divisée en la voie des MAPK proprement dite, activables par des facteurs de croissance, et la voie des SAPK, Stress-Activated Protein Kinases, activables par certains types de stress. Cette activation peut également être induite par une stimulation au TGF- $\beta$ 1. Une fois phosphorylé, le complexe  $p38^{MAPK}$  pénètre dans le noyau et va phosphoryler ATF2 qui devient alors actif (Hanafusa *et al.*, 1999). ATF2 est un facteur de transcription qui reconnaît le promoteur du TGF- $\beta$ 1 et induit sa transcription (Chiu, *et al.*, 2001). TGF- $\beta$ 1, une fois transcrit et traduit, est libéré dans le milieu extracellulaire où il se lie à son récepteur II, ce qui provoque la dimérisation avec le récepteur I. Ces deux-ci s'auto-phosphorylent et deviennent alors actifs. Ce qui déclenche une deuxième vague d'activation de  $p38^{MAPK}$  qui se lie à ses séquences consensus et permet l'apparition d'une partie des caractéristiques de la sénescence répllicative dont la SA  $\beta$ -gal, une morphologie sénescents et la surexpression de l'ApoJ, de la fibronectine, de l'ostéonectine et de SM22 (Frippiat *et al.*, 2002).



D'autre part, quand on soumet une cellule à des stress à l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , des dommages à l'ADN apparaissent. Ces dommages activent c-Abl, qui lui-même active p53, ce qui amène à la transcription de p21<sup>Wak-1</sup>. Il n'y a donc plus de phosphorylation de pRb car la kinase dépendante des cyclines, capable de la phosphoryler, est inhibée. Tout cela conduit à un arrêt du cycle cellulaire (Fig I-9).

## Quatrième partie : Expression ectopique de la télomérase en cellules normales

Des travaux ont déjà été effectués sur des cellules qui ont été transfectées avec l'ADNc de la sous-unité catalytique de la télomérase humaine (hTERT). Ainsi J.P. de Magalhaes a mis en évidence l'apparition des biomarqueurs de la sénescence lorsque l'on soumet des fibroblastes hTERT de souche BJ à différents types stress (de Magalhaes, *et al.*, 2002). Le nombre de cellules positives pour l'activité S-A- $\beta$  galactosidase augmente en même proportion chez les cellules hTERT que chez les cellules normales. Les fibroblastes hTERT de souche BJ montrent également une morphologie de type sénescence. Leur capacité de prolifération est aussi fortement diminuée. Suite à ces résultats qui montrent que les cellules hTERT de souche BJ sont capables d'entrer en SIPS, on a étudié le raccourcissement des télomères chez ces cellules. Après le stress, le raccourcissement normal observé après chaque division cellulaire est multiplié par deux pour les cellules BJ et est multiplié par quatre pour les cellules h-TERT BJ. Il est donc bien prouvé que les stress affectent la longueur des télomères même chez les cellules transfectées avec la télomérase, sans que l'on puisse expliquer les différences entre les cellules BL et les hTERT BJ. Des expériences ont aussi montré paradoxalement que l'activité télomérase n'est pas diminuée suite à un stress. D'autres expériences ont montré que les cellules h-TERT qui peuvent entrer en SIPS à des doses subcytotoxiques d'UVB ou de  $\text{H}_2\text{O}_2$  montrent une certaine résistance face à l'apoptose et à la nécrose induite par les stress. Il y aurait donc un effet protecteur de la télomérase face à l'induction de l'apoptose. Par ces études, on a confirmé que ce n'est pas le raccourcissement télomérique qui induisait la SIPS car la longueur des télomères ne semblait n'être que très peu affectée chez les cellules h-TERT entrées en SIPS (Magalhaes, *et al.*, 2002). D'autre part, Gorbunova *et al* ont pu montrer l'influence du type de promoteur qui module l'expression de la sous-unité hTERT. En effet, lorsque la sous-unité hTERT est sous le contrôle d'un promoteur fort, la cellule voit son activité télomérique augmentée. Chez cette population, on peut observer des cellules sénescences. Par contre quand la sous-unité catalytique de la télomérase est suivie d'un promoteur faible, les cellules sont bien immortalisées (Gorbunova, *et al.*, 2002). Comme les IMR-90 ont été transfectées avec un plasmide dont le promoteur de la sous-unité catalytique de la télomérase est faible, les cellules sont donc bien immortalisées et on ne retrouve pas de cellules sénescences dans notre population de départ. Ils ont également montré que ce n'est pas le raccourcissement des télomères qui provoquent l'arrêt du cycle cellulaire (Cui, *et al.*, 2002).

Des hypothèses sur le rôle protecteur de la télomérase contre l'apoptose ont été émises. Cette protection pourrait se faire par un mécanisme autre que le maintien de la longueur télomérique. La télomérase pourrait également inhiber l'une des premières étapes de l'apoptose. Ou encore, celle-ci serait capable de masquer partiellement les dommages à l'ADN à la machinerie de l'apoptose, mais elle serait incapable de permettre une réparation totale des télomères. Il est aussi probable que l'expression ectopique de hTERT entraîne des variations importantes dans l'expression génique.



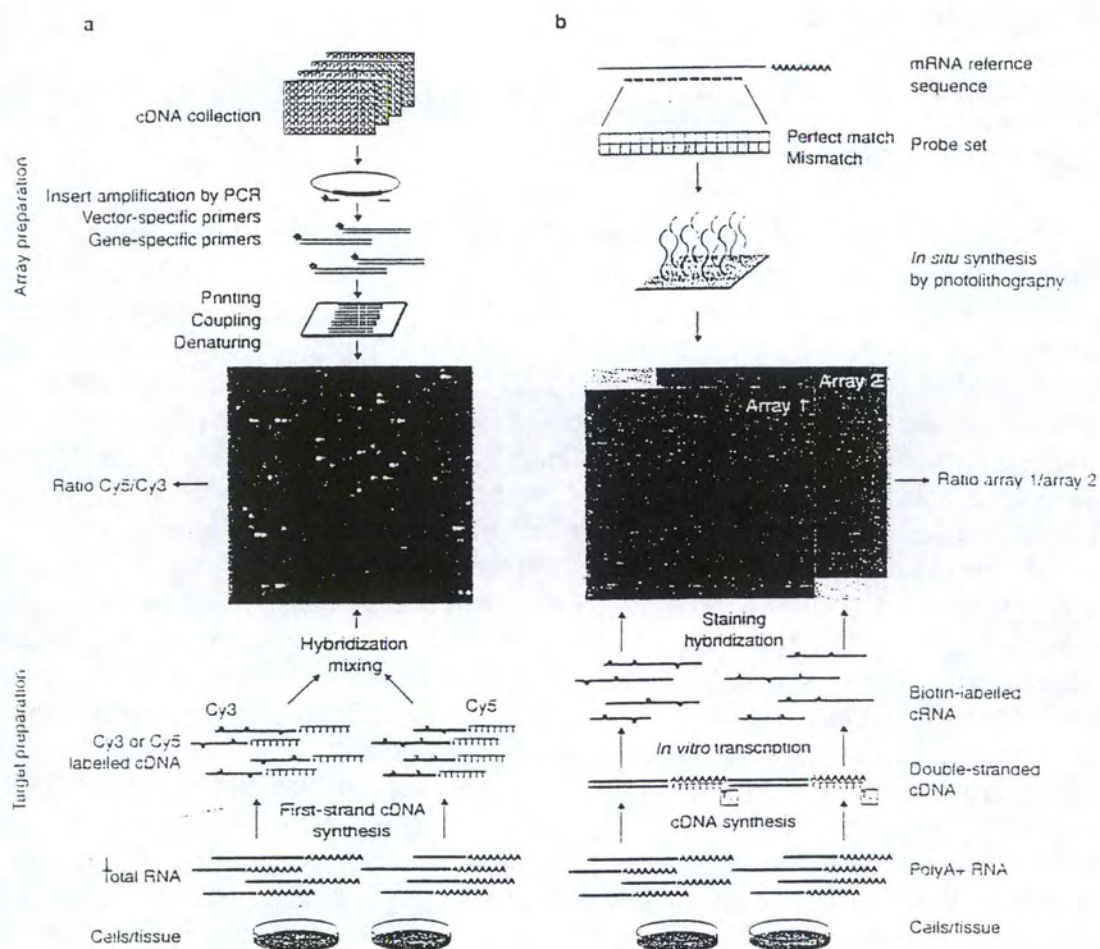


Figure I-10 : Schéma comparant le damier à basse et à haute densité.

- a) Damier à basse densité
- b) Damier à haute densité

## Cinquième partie : Etude de l'expression génique par damier à ADN

L'étude de variations du niveau d'expression de gènes peut être réalisée en étudiant le niveau des ARNm. Afin de mettre en évidence les variations d'expression d'ARNm, différentes techniques peuvent être utilisées. On distingue les méthodes *à priori* (RT-PCR, Northern Blot, RNase protection assay, damier à basse densité, etc.) par lesquelles on étudie le niveau d'expression de gènes prédéfinis et les méthodes sans *à priori* (damiers haute densité, differential display, etc.) qui permet une étude globale du transcriptome (Kozian *et al.*, 1999). Dans cette introduction, nous nous focaliserons sur le damier à haute et à basse densité (Fig I-10) (Schulze *et al.*, 2001).

### 1. Microdamiers à haute densité (Plus de 400 spots/cm<sup>2</sup>)

Ces damiers sont utilisés afin de contrôler le niveau d'expression de plusieurs milliers de gènes. Ils sont constitués d'oligonucléotides définis à partir de séquence de référence. Les échantillons d'ARNm sont retro-transcrits. On incorpore un nucléotide couplé à un fluorochrome qui permettra la visualisation. Les ADN complémentaires sont hybridés sur le damier. Cette technique peut présenter des problèmes de spécificité et de réactions croisées.

### 2. Microdamiers à basse densité (Moins de 400 spots/cm<sup>2</sup>)

Le microdamier à basse densité permet une étude simultanée de l'expression d'un grand nombre de gènes connus. Sa construction est réalisée en utilisant comme trappeurs de l'ADNc. Le microdamier à basse densité est mis en présence d'échantillons d'ADNc biotylés issus de la retro-transcription des ARNm extrait. La révélation se fait grâce à un anticorps anti-biotine couplé à un fluorochrome. Cette technique présente l'avantage de permettre en une seule hybridation l'étude de l'expression de l'ensemble des gènes spottés sur le damier (Figure I-11). Durant ce mémoire de fin de licence, nous avons utilisé la senechips qui permet l'étude de l'expression de gènes connus pour varier lors de la sénescence. Parmi ceux-ci, on retrouve les 4 gènes qui sont connus pour être surexprimés lors de la sénescence chez les fibroblastes humains IMR-90 : l'Apo J, la fibronectine, l'ostéonectine, SM22. Le design de la senechips est fourni dans les résultats (Figure III-7). Les différents gènes spottés sur la senechips ont pu être classés en différentes catégories (voir tableau I-1).

## Sixième partie : But du mémoire

Les fibroblastes humains acquièrent différentes caractéristiques lors de leur vieillissement et lorsqu'ils sont soumis à des stress oxydatifs subcytotoxiques. Parmi celle-ci, on distingue une morphologie sénescence, l'activité  $\beta$ -gal associée à la sénescence (S-A  $\beta$ -gal), le raccourcissement des télomères, des modifications du niveau d'expression de certains gènes ainsi qu'un arrêt irréversible du cycle cellulaire.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au rôle de la télomérase dans l'apparition de ces caractéristiques après un stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



# Schéma d'hybridation sur damier à ADN

## Fibroblastes IMR90 hTERT

Fibroblastes IMR90 hTERT :  
Stressés sous  $H_2O_2$  (entre 0 et 120 h)  
Stimulés au TGF- $\beta$ 1  
Stressés sous  $H_2O_2 \pm$  anti-TGF- $\beta$ 1

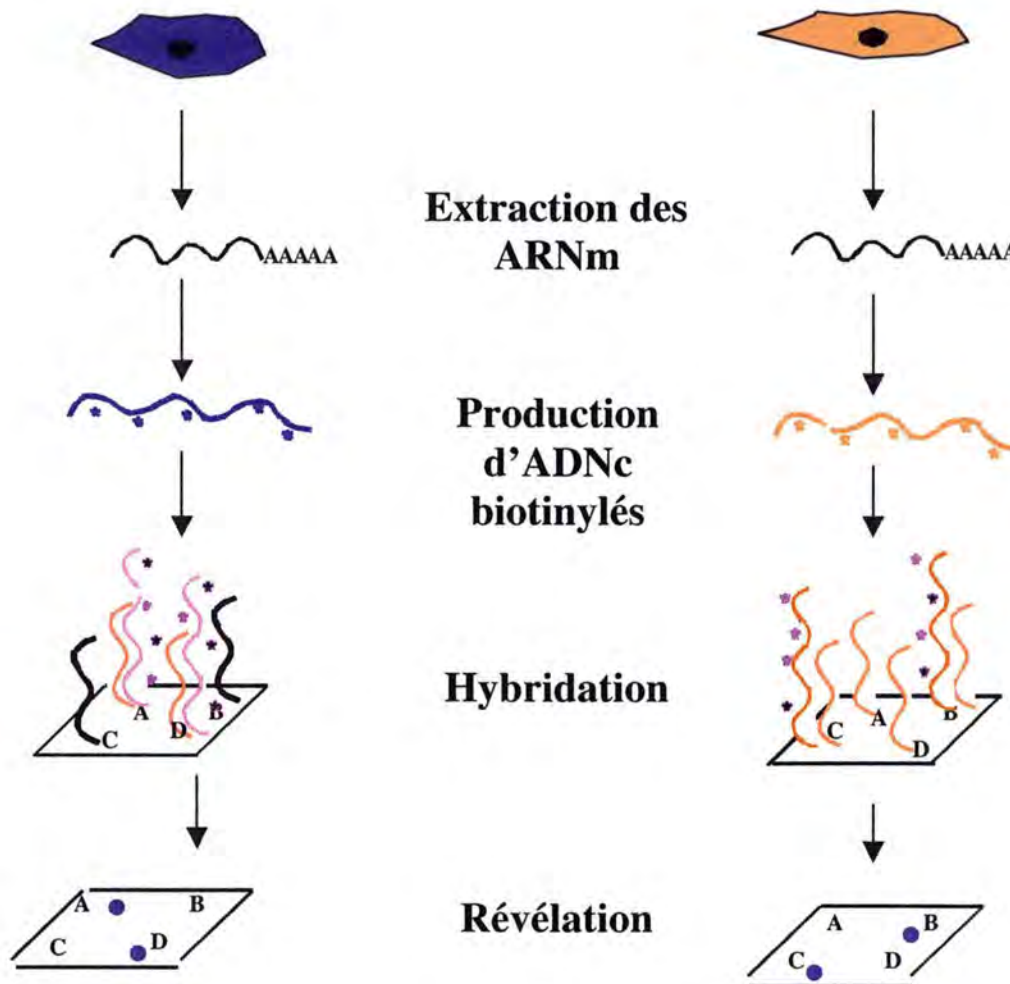


Figure I-11 : Schéma général du principe du damier. L'ARNm est d'abord purifié et ensuite rétro-transcrit en ADN complémentaire. Lors de la rétro-transcription, il y a incorporation de dCTP biotinylés qui permettront la visualisation des spots. Cette visualisation se fait grâce à un anticorps anti-biotine couplé à un fluorochrome, la cyanine 3.

Fonctions principales	Exemples de gènes
Cycle cellulaire	IGF-1 c-fos Kinases dépendantes de cyclines Famille des cyclines Famille d'E <sub>2</sub> F Famille des inhibiteurs de kinases dépendantes de cyclines. (CDKI) p53 Rb télomérase
Matrice extracellulaire	Collagènes Elastine Fibronectine Metalloprotéinases Ostéonectine TIMP (1 et 2)
Pro ou anti apoptose	BAX Bcl-2 Caspases IGF-1 recepteur
Système de défense	Mn-SOD ApoJ Heme oxygenase JNK (1-3)
Inflammation	Cyclooxygénase 2
Synthèse protéique et processing	Ubiquitin ligase E3 Protéasome sous-unité HC3 Protéasome sous-unité p42 Protéasome sous-unité p55
Cytokines	IL-1 alpha IL-1 beta TGF-beta 1
Métabolisme énergétique	Pyruvate Kinase
Maintien du potentiel redox	Glucose-6-phosphate dehydrogénase

Tableau I-1 : Exemples de gènes impliqués dans la sénescence réplivative et la sénescence induite prématurément par des stress oxydatifs subcytotoxiques.



---

Plus précisément, nous avons voulu savoir si, d'une part, les fibroblastes de souche IMR-90, immortalisés par la sous-unité catalytique de la télomérase, hTERT, étaient capables d'entrer en sénescence induite prématurément par des stress oxydatifs à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  (SIPS) et si, d'autre part, les mécanismes d'établissement de la SIPS chez les fibroblastes IMR-90 hTERT étaient similaires de ceux connus pour les fibroblastes IMR-90.

## **MATERIELS ET METHODES**



## 1. Culture cellulaire

Nous avons utilisé des fibroblastes diploïdes de poumon fœtal d'origine humaine issu de la souche IMR-90 ainsi que ces mêmes cellules immortalisées grâce à la transfection de la sous-unité catalytique de la télomérase, hTERT.

Ces cellules sont maintenues en culture selon la méthode décrite par Hayflick (Figure II.1) (Hayflick *et al.*, 1961). Lorsqu'elles sont confluentes, c'est-à-dire lorsqu'elles forment une monocouche couvrant l'entièreté de la surface de la boîte de culture, elles sont repiquées dans des conditions stériles.

### Matériel

- Milieu MEM + AB : milieu MEM (Modified Eagle Medium) enrichi d'antibiotiques : Amphotéricine-B : 0,25 µg/ml (Gibco, Grande-Bretagne), Streptomycine sulfate : 100 µg/ml (Sigma, USA), Pénicilline : 100 U/ml (Sigma, USA)
- Milieu de culture : Milieu MEM + AB + 10 % FBS : Milieu MEM additionné de 10 % de sérum de veau fœtal. Ce sérum est indispensable car il contient de nombreux facteurs de croissance nécessaire à la survie cellulaire (Gibco BRL, Grande-Bretagne)
- Trypsine : Trypsine à 0.25 % dans un tampon Tris (Gibco, Grande-Bretagne)
- Solution de rinçage : PBS (Phosphate Buffer Saline, 10 mM, NaCl 0.9 %, pH 7.4)
- Boîtes de culture stériles de 25 cm<sup>2</sup> (T25) ou 75 cm<sup>2</sup> (T75) ou 150 cm<sup>2</sup> (T150) (Corning, USA)

### Méthode

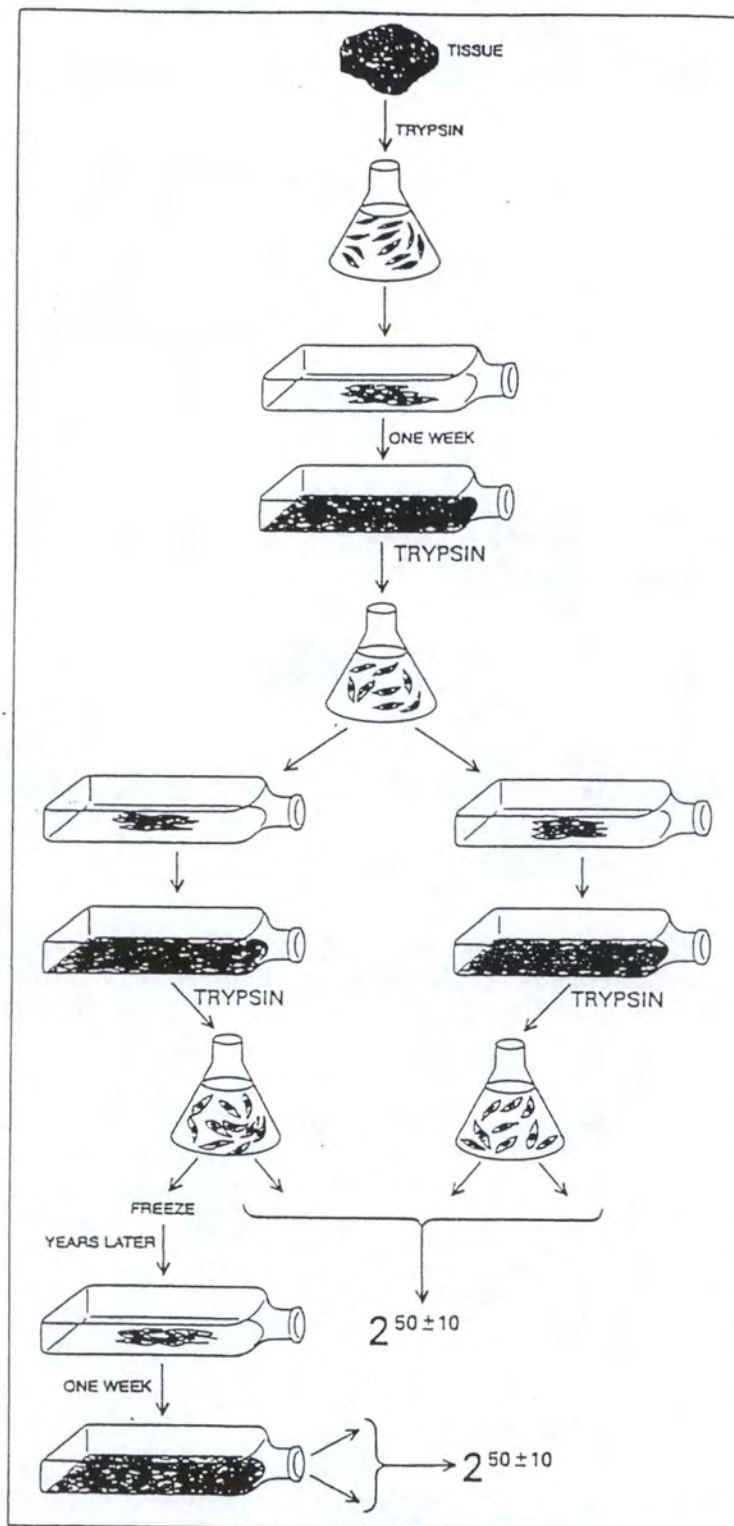
- Préchauffer le milieu de rinçage, le milieu de culture et la trypsine à 37°C
- Décanter et rincer les cellules avec 10 ml de milieu de rinçage afin d'éliminer toute trace de sérum. En effet, celui-ci contient des protéases qui pourraient inhiber l'action de la trypsine
- Ajouter 1 ml de trypsine par boîte de culture de 75 cm<sup>2</sup> (T75) et, incuber les cellules à 37°C jusqu'à ce qu'elles soient toutes détachées, c'est-à-dire pendant environ 5 min
- Rajouter 10 ml de milieu de culture dans la T75, et rompre les agrégats cellulaires à l'aide d'une pipette pasteur
- Après homogénéisation, répartir les cellules en 2 ou 4 boîtes et ajouter du milieu de culture afin d'obtenir un volume final de 15 ml par T75
- Placer les boîtes de culture dans une étuve à 37°C

## 2. Stress à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et Stimulation au TGF-β1

Afin d'étudier l'effet des stress oxydatifs sur les cellules IMR-90 et IMR-90 hTERT, nous avons effectué un stress unique de deux heures sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respectivement à 150 µM et 200 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ensuite les cellules sont maintenues dans du MEM + AB + 10% de sérum.

### Matériel

- Eau désionisée



**Figure II-1 :** Représentation schématique du principe de culture cellulaire (Hayflick, L., 1996).



- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 M (Merck, Germany)
- Seringue (Terumo Europe nv, Belgium)
- Filtre 0,2 µM (Sarstedt, Germany)
- Milieu de culture
- TGF-β1 (R&D system, Deutschland)

### Méthode

- Diluer l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans de l'eau désionisée. L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est une molécule instable, les préparations doivent être en conséquence fraîches
  - Stériliser la solution en la passant sur filtre
  - Afin d'obtenir la concentration souhaitée, diluer ensuite l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans du milieu de culture
  - Remplacer le milieu de culture par le milieu de stress et incubé 2 h dans une étuve à 37°C
  - Décarter complètement le milieu de stress et remettre 15 ml de milieu de culture
- La stimulation au TGF-β1 se fait à différentes concentrations en TGF-β1 (10 ng/ml).

## 3. Dosage protéique par la méthode de Lowry

### Matériel

- Etalon Protéine : sérum albumine bovine (BSA) à 0.2 g/l (Biorad, Allemagne)
- Hydroxyde de sodium (NaOH) 0.5 N (Merk, Allemagne)
- Mixture alcaline composée de :
  - 2 % carbonate de sodium (Merck, Allemagne)
  - 0,01 % sulfate de cuivre (Merck, Allemagne)
  - 0,02 % tartrate de sodium/potassium (Merck, Allemagne)
- Réactif phénol de Folin-Ciocalteu (Sigma, USA)
- Spectrophotomètre (Ultrospect 2100 pro, Biochrom, England)

### Méthode

Cette méthode se base sur le principe qu'une fois dénaturées au NaOH, les protéines exposent leurs groupements aux réactifs. Les ions cuivriques, présents dans la solution alcaline complexent les protéines en se liant avec les atomes d'azote des liens peptidiques. De plus, le cuivre catalyse la réduction, par les résidus tyrosines et tryptophane des protéines, du complexe anions phosphomolybdate/phosphotungstate contenu dans le réactif de Folin-Ciocalteu. Cette réaction conduit à la formation d'un composé bleu. L'intensité de la coloration bleue est lue à 660 nm au spectrophotomètre et est proportionnelle à la quantité de protéines présentes.

- Décarter le milieu des cellules et rincer deux fois au PBS
- Ajouter 1 ml de NaOH et incubé 30 min pour lyser les cellules et dénaturer les protéines
- Homogénéiser le lysat et en prélever 0,4 ml
- Parallèlement, préparer :
  - les blancs qui sont composés de 0,4 ml de NaOH
  - les étalons
- A chaque échantillon, ajouter 2 ml de mixture alcaline de 30 sec en 30 sec, vortexer, puis incubé pendant 15 min
- Ajouter, en respectant le temps, 0,2 ml de réactif de Folin (dilué 2X)

PBS (phosphate Buffer Saline)	Tampon phosphate additionné de NaCl 0,9%, pH 7,4
Solution de fixation	Solution aqueuse diluée dans du PBS * Formaldéhyde 2%(Belgolabo, Belgique) * Glutaraldéhyde 0,2% (Fluka, Pays-Bas)
Solution de coloration	*Tampon phosphate à pH 6 : 4 ml(Merck, Allemagne) *Ferrocyane de potassium 0,1M : 1 ml (Merck, Allemagne) *Ferricyane de potassium 0,1M : 1 ml (Merck, Allemagne) *Chlorure de Sodium (NaCl) 5 M :0,6 ml (Merck, Allemagne) *Chlorure de magnésium (MgCl <sub>2</sub> ) 1 M : 40 µl (Merck, Allemagne) *solution X-gal : 1 ml *Eau désionisée : 12,36 ml
Solution de X-gal	20 mg/ml de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl B-D-galactopyranoside (X-gal : Promega) diluée dans diméthylformamide (DMF : Sigma, USA).

**Tableau II-1** : Réactifs nécessaires à la visualisation de l'activité S-A  $\beta$ -gal



- Agiter immédiatement et incuber 30 min
- Lire l'absorbance à 660 nm de 30 sec en 30 sec

La concentration des échantillons se calcule grâce à la formule :  $\text{Concentration } (\mu\text{g/ml}) = 100 * (\text{D.O. échantillon} - \text{D.O. du blanc}) / (\text{D.O. étalon} - \text{D.O. du blanc}) * \text{dilution}$

#### 4. Détection de l'activité S-A $\beta$ -galactosidase

Matériel Voir tableau II-1

##### Méthode

- Repiquer les cellules à faible densité dans une plaque 6 puits (Corning Incorporated, Belgique) contenant 2 ml de milieu de culture et laisser 24 h dans une étuve à 5 %  $\text{CO}_2$  et à 37°C
- Décanter le milieu de culture et rincer les cellules deux fois au PBS
- Fixer les cellules avec 2 ml de solution de fixation pendant 5 min, puis les rincer à nouveau deux fois au PBS
- Ajouter 2 ml de solution de coloration afin de détecter l'activité S-A  $\beta$ -gal et incuber 12 à 17 h à 37°C en absence de  $\text{CO}_2$
- Décanter la solution de coloration et laver les cellules 2X au PBS puis au méthanol
- Une fois les boîtes sèches, on peut déterminer la proportion de cellules sénescents (colorées) et des cellules jeunes.

#### 5. Estimation de la synthèse d'ADN par incorporation de thymidine tritiée

##### Matériel

- Trypsine
- Chambre de Newbawer
- Plaques 24 puits stériles (Corning Incorporated, USA)
- Thymidine tritiée (Perkin Elmer, Life science, Inc., USA)
- TCA 10 % (Acide trichloroacétique) (Merck, Germany)
- Ethanol 70 % (Carlo erba reagenti, France)
- NaOH (0.5 N) et HCl (0.5N) (Merck, Germany)
- Aqualuma (Lumac, Pays-Bas)
- Compteur à scintillations (modèle 2100TR Packard Instrument Company, U.S.A.)

##### Méthode

- Trypsiniser les cellules cultivées en boîtes T75 et les resuspendre dans du milieu de culture
- Estimer la densité cellulaire à l'aide d'une chambre de newbawer
- Repiquer les cellules dans des boîtes 24 puits à une densité de 20.000 cellules par puits. Chaque puits recevant 1 ml de milieu de culture contenant 1  $\mu\text{Ci/ml}$  de thymidine tritiée
- Incuber les cellules à 37°C pendant 24 h afin de permettre l'incorporation de la thymidine tritiée

- Après 24 h, décanter le milieu de culture contenant la thymidine tritiée et rincer les puits au PBS (2x). Ensuite les puits reçoivent 0,5 ml de TCA et sont lavés 1x à l'éthanol et 1x au PBS
- Ajouter dans chaque puits 250 µl de NaOH afin de lyser les cellules et incuber 30 min
- Neutraliser l'action du NaOH en ajoutant un volume égal d'HCl
- Homogénéiser et reprendre toute la solution à laquelle une solution d'Aqualuma est ajoutée (5 ml). Cette substance permet de visualiser l'incorporation de thymidine tritiée au compteur à scintillations par une réaction qui transforme l'énergie radioactive contenue dans la solution en énergie lumineuse (photons).

## 6. Western Blot

La première étape de cette technique est une migration sur gel d'acrylamide en présence de SDS, qui dénature les protéines et les charge négativement. Cette migration permet de séparer les protéines selon leur poids moléculaire. Le transfert de celles-ci sur membrane de polyvinylidène difluorure (PVDF) permet en outre leur détection à l'aide d'un anticorps spécifique (anticorps primaire) et d'un anticorps secondaire conjugué à une peroxydase. La détection est réalisée en présence du substrat de la peroxydase et de luminol. L'oxydation du luminol s'accompagne d'émission de lumière qui peut être détectée à l'aide d'un film photographique.

### 6.1. Extraction protéique

#### Matériel

- Tampon de lyse : 62,5 mM Tris HCl pH 6.8 : 0,38 gr Tris + 40 ml H<sub>2</sub>O  
SDS 2 %, Glycérol 10 %, DTT 50 mM, Bleu de bromophénol 0,1 %

#### Méthode

- Rincer les cellules 2 fois avec du PBS froid
- Ajouter 500 µl de tampon de lyse par T75 et racler les cellules.
- Récolter le lysat dans un eppendorf et le soniquer durant 30 sec
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 10 min afin de culotter les débris cellulaires insolubles et transférer le surnageant dans un nouveau eppendorf et congeler à -20°C

### 6.2. Migration

#### Matériel

- Extraits cellulaires
- Centrifugeuse (Biofuge pico, Allemagne)
- Minigel NUPAGE (Invitrogen, U.S.A.)
- Tampon de migration : Tampon MOPS 50 ml (Invitrogen, U.S.A.) et eau distillée : porter à 1 l



- Minicuve (Invitrogen, U.S.A.)
- Etalon de poids moléculaire : Seeblue plus 2 pre-stained protein standard (Invitrogen, U.S.A.)
- Générateur (Biorad Power PAC 300)

### Méthode

- Faire bouillir 5 min les lysats cellulaires et les centrifuger 5 min à 13000 rpm
- Déposer les échantillons sur gel et laisser migrer 50 min à 200 volts dans le tampon de migration

## 6.3. Transfert

### Matériel

- Eponges et Papier Whatman (Merck, Allemagne)
- Membrane PVDF (Amersham pharmacia Biotech UK Limited, Suède)
- Tampon de transfert : Tampon de transfert NUPAGE 50 ml (Invitrogen, U.S.A.), Méthanol 20 ml (40 ml si 2 gels) et Eau distillée : porter à 200 ml

### Méthode

- Enlever le gel du moule et retirer le stacking gel (les puits) ainsi que la bande inférieure du gel à l'aide d'une spatule
- Effectuer le montage suivant :
  - Electrode négative
  - 2 éponges imbibées de tampon de transfert NUPAGE
  - 2 whatmans imbibés de tampon de transfert NUPAGE
  - gel
  - membrane PVDF (préalablement équilibrée dans le méthanol, rincer à l'eau, et imbibée dans le tampon de transfert)
  - 2 whatmans imbibés de tampon de transfert
  - 2 éponges imbibées de tampon de transfert
  - Electrode positive
- Le transfert des protéines du gel sur la membrane PVDF en présence de tampon de transfert se fait sous 30 V pendant 2h30

## 6.4. Blocking et révélation

### Matériel

- Tampon de rinçage: TBS-Tween 0.1%
- Anticorps primaires : p21 : dilution 500x : Anticorps monoclonal de souris (Biotech, Santa Cruz)  
 $\alpha$ -tubuline : dilution 5000x : Anticorps monoclonal de souris

(Innogenex, UK)

- Anticorps secondaire: Anti -souris : dilution 10000x (Amersham Biosciences, Buckinghamshire)
- Substrat de révélation : Supersignal West Pico chemiluminescent substrate (Pierce, U.S.A.)
- Film photographique (Bioscience, Amersham, UK)
- Solution de révélation et de fixation (Ilford rapid fixer, Ilford Imaging, U.S.A.)

## Méthode

- Bloquer la membrane en présence de TBS-T + Gloria (5 %) durant 2 h sur un rotateur
- Incuber la membrane avec l'Ac primaire dilué dans du TBS-T + gloria (5 %) durant 1 h
- Rincer la membrane 3 fois durant 5 min avec du TBS-T + gloria (5 %)
- Incuber la membrane avec l'Ac secondaire dilué dans du TBS-T + gloria (5 %) durant 1 h
- Rincer la membrane une fois 5 min avec du TBS-T 0.1 % + gloria (5 %) puis 3 fois 5 min avec du TBS-T 0.1 %
- Placer la membrane avec le substrat de la peroxydase
- En chambre noire, exposer un film autoradiographique sur la membrane
- Placer le film dans la solution de révélation puis rincer dans de l'eau
- Placer le film dans la solution de fixation
- Rincer à l'eau

## 7. Real-time RT-PCR

### 7.1. Isolation de l'ARN messager (ARNm)

L'ARNm doit être isolé des différents constituants cellulaires, ainsi que de l'ADN, des ARN ribosomiques, et des ARN de transferts. Pour cela, les cellules sont lysées et les débris cellulaires éliminés par centrifugation. Les ARNm sont séparés des autres constituants cellulaires grâce à leur queue poly A qui se lie à des billes de cellulose présentant des oligo dT. Les billes de cellulose sont isolées et l'ARNm qui y est accroché est élué. Celui-ci est précipité puis quantifié grâce à un spectrophotomètre.

## Matériel

- Micro-Fast Track 2.0 Kit (Invitrogen Corporation, U.S.A.)
- Stock Buffer : 200 mM NaCl, 200 mM Tris, pH 7.5, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 % SDS
- Protéin/Rnase Degradér : mélange de protéases
- Binding Buffer : 500 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 7.5
- Low Salt Wash Buffer : 250 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 7.5
- Elution Buffer : - 10 mM Tris-Cl, pH 7.5
- Acétate de Sodium 2 M
- NaCl 5 M
- Glycogen carrier : 2 mg/ml dans de l'eau désionisée
- Poudre de cellulose oligo(dt)20-30 : cellulose oligo(dt) lyophilisée présdisposée dans dans microtubes à raison de 252 mg par fiole



- Seringue stérile avec aiguille 21G x 1 ½'' - 0.8 x 40 mm (Terumo, Belgique)
- Ethanol 100% (Merck, Allemagne)
- Centrifugeuse : Biofuge 17 RS (Heraeus Sepatech, Allemagne)

## Méthode

### a) Préparation des échantillons

- Transférer les cellules dans des tubes de 10 ml et centrifuger à 1000 rpm pendant 7 min à 4°C
- Décanter le surnageant et resuspendre le culot dans 5 ml de PBS froid (4°C)
- Centrifuger à 1000 rpm pendant 7 min à 4°C et resuspendre le culot dans du PBS froid (4°C) de sorte à avoir un maximum de 5 millions de cellules par ml

### b) Lyse des cellules

- Transférer les cellules dans des microtubes et centrifuger à 2000 rpm pendant 5 min à 4°C
- Resuspendre chaque culot dans 1 ml de tampon de lyse, lui-même composé de 1 ml de tampon stock + 20 µl de Protein/Rnase Degradar
- Homogénéiser les cellules avec une seringue dotée d'une aiguille 21G x 1 ½'' - 0.8 x 40 mm (2 à 4 fois) jusqu'à obtenir une solution fluide
- Incuber 20 min à 45°C et ajouter ensuite 63 µl de NaCl 5 M par ml de lysat et bien mélanger par inversion
- Cisailler l'ADN avec une seringue dotée d'une aiguille 21G jusqu'à ce que la solution ne soit plus visqueuse
- Transférer la solution dans une fiole contenant des billes de cellulose.
- Agiter légèrement les tubes pendant 20 min à température ambiante
- Culoter la cellulose à 6000 rpm pendant 5 min et éliminer le surnageant délicatement

### c) Lavages de la cellulose

- Resuspendre les billes de cellulose dans 1,3 ml de Binding Buffer et centrifuger à 6000 rpm pendant 5 min à température ambiante (Répéter l'opération 3x)
- Resuspendre la cellulose dans 300 µl de Binding Buffer et transférer l'échantillon dans une Spin Column
- Centrifuger à 6000 rpm pendant 10 sec à température ambiante
- Laver avec 500 µl de Binding Buffer et centrifuger à 6000 rpm pendant 10 sec à température ambiante (Répéter l'opération 3x)
- Resuspendre la résine dans 200 µl de Low Salt Buffer et centrifuger à 6000 rpm pendant 10 sec à température ambiante (Répéter l'opération 2x)

### d) Elution et précipitation de l'ARNm

- Ajouter 100 µl d'Elution Buffer et resuspendre les billes de cellulose
- Centrifuger à 6000 rpm pendant 10 sec et resuspendre les billes de cellulose avec 100 µl d'Elution Buffer
- Ajouter à l'ARNm récolté 10 µl de glycogène carrier, 30 µl de sodium acétate et 600 µl d'Ethanol absolu et bien mélanger
- Congeler pendant 30 min à - 70°C, puis centrifuger à 16000 rpm pendant 15 min à 4°C
- Laisser sécher le culot en laissant le microtube ouvert pendant 5 à 15 min

# Real-time PCR

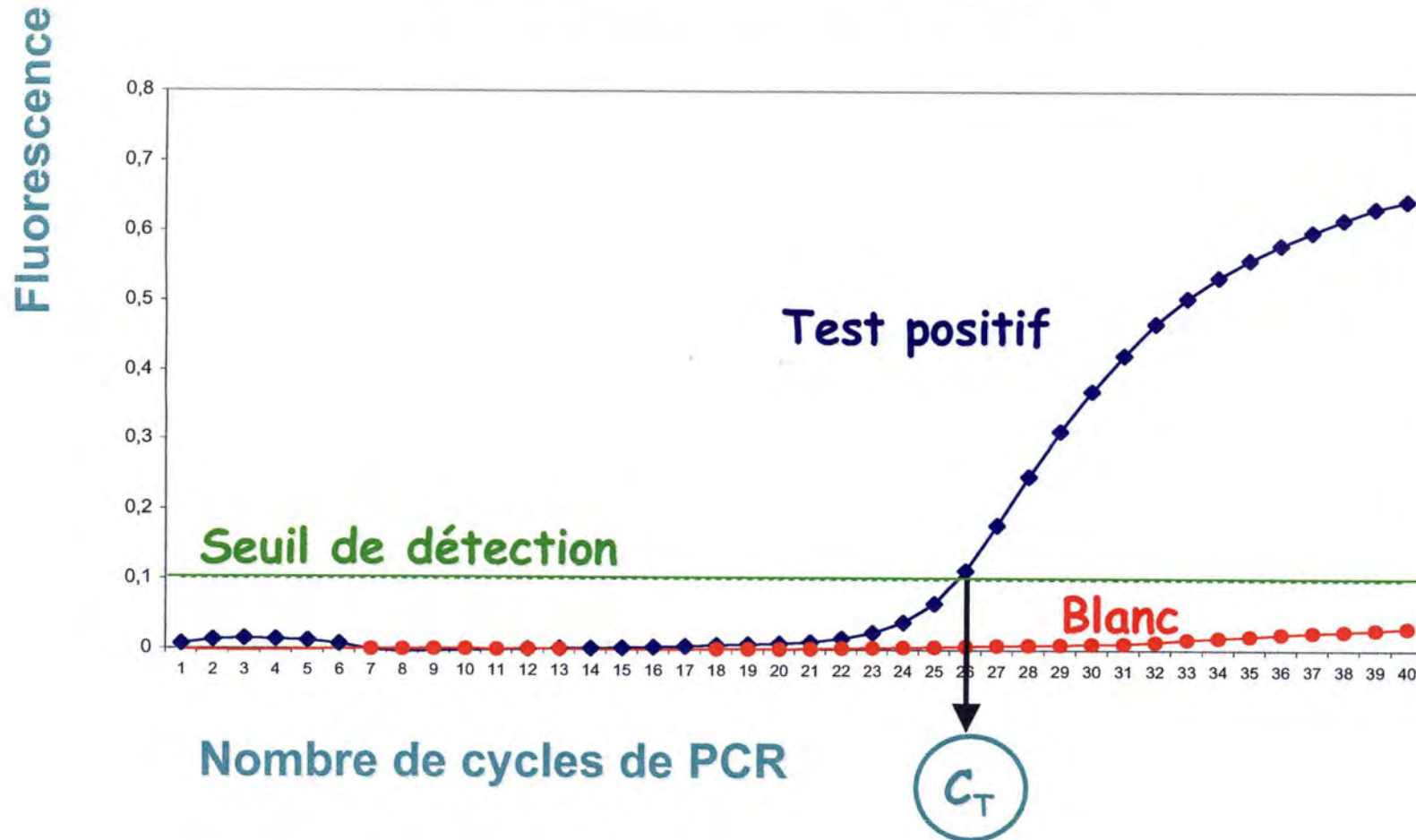


Figure II-2: Principe du Real-time PCR. La fluorescence augmente au cours du nombre de cycle d'amplification. Le  $C_T$  représente le cycle auquel la fluorescence dépasse significativement le bruit de fond.



- Resuspendre l'ARNm avec 10 µl d'eau Rnase free et en déterminer la concentration par mesure d'absorbance à 260 nm

## 7.2. Transcription inverse (RT)

Cette étape permet la synthèse d'ADN complémentaire (cDNA) à partir d'ARN messager (ARNm). Elle fait appel à des amorces poly-T venant s'hybrider sur la queue poly-A des ARNm. La synthèse de l'ADNc est réalisée par l'élongation de l'amorce poly-T à partir de son extrémité 3' OH par une Superscript Reverse Transcriptase.

### Matériel

- Amorce poly-T : Oligo dT (Gibco BRL, USA)
- Buffer RT 5X (Invitrogen, England)
- Dithiotréitol (DTT) 0,1 µM (Gibco BRL, USA)
- dNTP set (Eurogentec, Belgique)
- RNAsin Ribonucléase Inhibitor (40 U/µl) (Promega, USA)
- Superscript RII (200 U/µl) (Gibco BRL, USA)
- Ribonucléase H (RNase H) (2 U/µl) (Gibco, USA)
- Eau Rnase free (Promega, USA)

### Méthode

- Mélanger 0,5 µg d'ARNm et 1 µl de DNase et incubé 20 min à 37°C
- Arrêter la réaction en mettant les tubes 5 min à 75°C et ajouter ensuite 2 µl d'oligo dT (500 ng/µl)
- Préparer le Mix suivant : 4 µl Buffer RT, 2 µl DTT, 1 µl RNAsin, 1 µl dNTP mix, 1 µl H<sub>2</sub>O
- Ajouter 9 µl de ce mix par échantillon et incubé 5 min à température ambiante
- Ajouter 1,5 µl de SuperScript RII et incubé 1h30 à 42°C
- Incuber 15 min à 70°C, puis ajouter 1 µl Rnase H
- Incuber 20 min à 37°C et congeler immédiatement à -20°C

## 7.3. Real-time RT-PCR(Figure II-2)

### Matériel

Utilisation du master mix « SyBR Green PCR » (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.) contenant :

- SyBR Green I dye (2X), Ampli Taq Gold DNA polymérase, DNTPs, Passive référence (ROX), Primers (voir Tableau II-2)

### Méthode

GENE	SEQUENCE	POSITION	Cc	Tm
OSTEONECTINE	CAG ACC TGT GAC CTG GAC AAT G	868-889	300nM	81
	GGA AGG AGT GGA TTT AGA TCA CAA GA	957-982	300nM	
RPL 13A	CTC AAG GTC CGT CTG AA	392-411	300nM	83
	TGG CTG TCA CTG CCT GCT ACT	465-485	300nM	
SM22	CGT GGA GAT CCC AAC TGG TT	511-530	300nM	80
	AAG GCC AAT GAC ATG CTT TCC	586-606	50nM	
TGF-B1	AGG GCT ACC ATG CCA ACT TCT		900nM	
	CCG GGT TAT GCT GGT TGT ACA		900nM	
APO J	GGA TGA AGG ACC AGT GTG ACA AG	937-959	300nM	
	CAG CGA CCT GGA GGG ATT C	1032-1050	50nM	
FIBRONECTINE	TGT GGT TGC CTT GCA CGA T	5023-5041	900nM	82
	GCT TGT GGG TGT GAC CTG AGT	5111-5131	900nM	
GAPDH	ACC CAC TCC TCC ACC TTT GAC	977-997	900nM	78
	GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA	1101-1125	900nM	
h-TERT	GACATGGAGAACAAGCTGTTTGC		300nM	
	GAGGTGTCACCAACAAGAAATCATC		300nM	
p21 <sup>Waf-1</sup>	CTGGAGACTCTCAGGGTCGAA	495-515	300nM	83
	CCAGGACTGCAGGCTTCCT	599-617	300nM	

**Tableau II-2** : Liste des amorces pour la real-time RT-PCR avec leur séquence, leur position, et leur température de melting.



- Diluer nos échantillons d'ADNc
- Par gène étudié, préparer le Mix suivant (différents pour chacun des gènes dont on étudie l'expression) :  
12,5 µl du Mix SyBR Green, 2,5 µl d'amorce forward, 2,5 µl d'amorce reverse, 2,5 µl d'eau distillée
- Mettre 20 µl de Mix dans chaque puit ainsi que 5 µl d'ADNc
- Lancer le programme ABI Prism

## 7.4. Analyse des résultats

L'analyse des résultats commence par la détermination des Ct (cycles seuils) qui s'obtiennent en fixant le seuil de détection dans la zone d'amplification exponentielle. Ce cycle seuil correspond au cycle auquel l'intensité de la fluorescence est significativement plus élevée que celle du bruit de fond. La valeur du Ct est inversement proportionnelle à la quantité d'ADNc de départ. Ensuite, on calcule le  $\Delta Ct$  pour chaque gène dans chacune des conditions et ce, par la formule :  $\Delta Ct = Ct$  de la condition contrôle -  $Ct$  de la condition de stress. Par après, on calcule l'efficacité  $E$  d'amplification pour chaque gène ( $E = 10^{-1/\text{pente de la courbe standard}}$ ), ainsi que leur efficacité  $E^{\Delta Ct}$  ou  $E^{\Delta Ct}$  ( $E^{\Delta Ct} = E$  propre au gène exposant  $\Delta Ct$ ). Enfin, on normalise les résultats en effectuant le ratio de chaque  $E^{\Delta Ct}$  pour les gènes d'intérêts sur l' $E^{\Delta Ct}$  d'un gène de référence ( $E^{\Delta Ct}$  du gène d'intérêt /  $E^{\Delta Ct}$  du gène de référence) (Pfaffl et al., 2001).

## 8. Microdamier à ADN

Le micro damier à ADN permet l'étude de l'expression d'une multitude de gènes dans différentes conditions. Dans le cadre de ce travail, nous avons travaillé avec la senechips. Le design de ce damier est représenté par la figure III-7 alors que la liste des gènes s'y rapportant est fournie en annexe.

### 8.1. La rétro-transcription

Lors de la transcription inverse, il y a incorporation de dCTP biotinylés afin que les ADNc produits puissent être détectables après leur hybridation à leurs trappeurs anti-complémentaires sur le micro-damier.

#### Matériel

- Amorce poly-T : Oligo dT (Gibco BRL, USA)
- Buffer RT 5X (Invitrogen, England)
- DTT 0,1 µM (Gibco BRL, USA)
- dATP, dCTP et dGTP 100 mM (Roche, Allemagne)
- dCTP 10 mM (Roche, Allemagne)
- dCTP biotinylés 1 mM (Roche, Allemagne)
- RNAsin Ribonucléase Inhibitor (40 U/µl) (Promega, USA)
- Superscript RII (200 U/µl) (Gibco BRL, USA)
- Ribonucléase H (RNase H) (2U/µl) (Gibco, USA)



## Méthode

- Préparer *le mix de dNTP* qui est composé de : 4 µl de dATP, 4 µl de dTTP, 4 µl de dGTP, 6,4 µl de dCTP, et de 64 µl de dCTP biotinylés
- Préparer ensuite *le mix de RT* qui est composé de : 1 µl de chaque standard interne (3) qui servent à la normalisation, 2 µl d'oligo dT, 0,5 µg ARNm et d'eau Rnase free pour obtenir un volume total de 9,5µl
- Préparer *le mix de réaction* composé de : 4 µl de Buffer, 2 µl de DTT 0,1 M, 1 µl de RNAsin et de 2 µl du mix de dNTP
- Incuber le mix de RT 10 min à 70°C pour dénaturer les ARNm, puis incuber 5 min sur glace
- Ajouter 9 µl du mix de réaction par échantillon et incuber 5 min à température ambiante
- Ajouter 1,5 µl/tube de SuperScript RII et incuber 1h30 à 42°C (Répéter l'opération 2x)
- Incuber 15 min à 70°C pour inhiber l'enzyme
- Ajouter 1 µl/tube de Rnase H et incuber 20 min à 37°C
- Dénaturer la RNase H en la mettant à 95°C pendant 3 min et congeler à -20°C

## 8.2. Hybridation

Les ADN cibles biotinylés issus de la transcription inverse sont mélangés à une solution d'hybridation et déposés dans des chambres d'hybridation qui sont ensuite fermés à l'aide d'un couvre-objet. Les lames sont alors placées dans un thermomixeur pendant toute une nuit durant laquelle les ADN cibles s'hybrident spécifiquement à leur trappeur anti-complémentaire. Après l'hybridation, les lames sont lavées avec une solution de tampon B1 0.1X + Tween 0.1% afin d'éliminer les ADN cibles ne s'étant pas appariés.

## Matériel

- Lames de verre spottées
- Hybri Buffer A et Hybri Buffer B (EAT, Belgique)
- Produits de - Tampon B1 : Uni Buffer dilué 4X (EAT, Belgique)
- Tween 20 (Sigma, USA)
- Thermomixeur (Eppendorf, Allemagne)RT
- ADN cible pour le contrôle positif 50nM
- Chambre d'hybridation (EAT, Belgique)

## Méthode

### a) Hybridation

- Préparer un *mix d'hybridation* : 6,5µl d'hybri Buffer A, 22,5µl de produit RT, 2µl de contrôle positif, 8 µl H<sub>2</sub>O, 26 µl Hybri Buffer B et ensuite placer les échantillons à 60°C
- Placer les chambres d'hybridation dans lesquelles on met 65µl du mix d'hybridation et recouvrir du couvre-objet
- Mettre les lames dans un thermomixeur à 1400 rpm, à 60°C, overnight



b) Lavages

- Retirer les couvre-objets et les chambres d'hybridation
- Laver 4x (2 min) les lames dans la solution B1 0,1x + Tween 0,1%

### 8.3. Détection des ADN cibles

Lors de la transcription inverse, les ADNcibles sont marqués par l'incorporation de dCTP biotinylés. La cible hybridée à son trappeur est révélée par un anticorps anti-biotine couplé à un fluorochrome, la cyanine 3. La cyanine 3 est mise en évidence par un scanner confocal. La cyanine 3 est excitée par un laser à 513nm et la lumière émise est reprise par un photodétecteur relié à un ordinateur. On obtient une image digitalisée des spots, dont l'intensité, proportionnelle à la quantité de cibles hybridées, est représentée par une échelle de couleurs artificielles. Après la révélation, les spots sont quantifiés par outils informatiques.

#### Matériel

- Tampon B1 1X : Uni Buffer dilué 4X (EAT, Belgique)
- Blocking reagent (EAT, Belgique)
- Conjugé anticorps anti-biot-cy3 (Sigma, USA)
- Transparent (Stabilo, Allemagne)

#### Méthode

- Préparation de la solution tampon B1 1X + Gloria : Dissoudre 0.1% de gloria dans du tampon B1 1X (800 µl par lame)
- Préparation de la solution anti-biotine-cyanine3 (à l'abri de la lumière) : Diluer 1000 fois la solution stock d'anticorps dans la solution de tampon B1 1X
- Dispenser sur un transparent 800 µl par lame de conjugué anti-biotine-cy3 dilué et disposer les lames, damiers vers le conjugué, sur le parafilm
- Incuber 45 min à température ambiante
- Laver 5 X les lames avec le tampon B1 0.1X + Tween 0.1 % pendant 2 min, puis 2 X avec de l'eau distillée pendant 2 min
- Centrifuger les lames à 6000 rpm pendant 5 min à température ambiante

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**



## **Première partie : Apparition des biomarqueurs chez les fibroblastes IMR-90 hTERT**

Les fibroblastes humains acquièrent différentes caractéristiques lors de leur vieillissement et lorsqu'ils sont soumis à des stress subcytotoxiques. Parmi celles-ci, on distingue l'activité  $\beta$ -gal associée à la sénescence (S-A  $\beta$ -gal), le raccourcissement des télomères, un arrêt du cycle cellulaire irréversible et des modifications du niveau d'expression de certains gènes. Afin d'étudier l'implication de la télomérase dans l'apparition de ces caractéristiques après un stress, nous avons utilisé des fibroblastes de souche IMR-90 immortalisés par la sous-unité catalytique de la télomérase. Nous nous sommes tout d'abord attardés sur l'apparition de certaines de ces caractéristiques (S-A  $\beta$ -gal, réduction du potentiel prolifératif, le niveau d'expression de la protéine p21<sup>Waf-1</sup>), et nous avons ensuite étudié l'expression différentielle de certains gènes chez les cellules IMR-90 hTERT traitées de différentes façons (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TGF- $\beta$ 1).

### **1. Mise au point des conditions de stress**

La première phase de ce travail consiste en la mise au point des conditions de stress. En effet, nous avons voulu déterminer la concentration optimale en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour laquelle nous pouvons mettre en évidence une sénescence prématurée sans causer de mortalité cellulaire

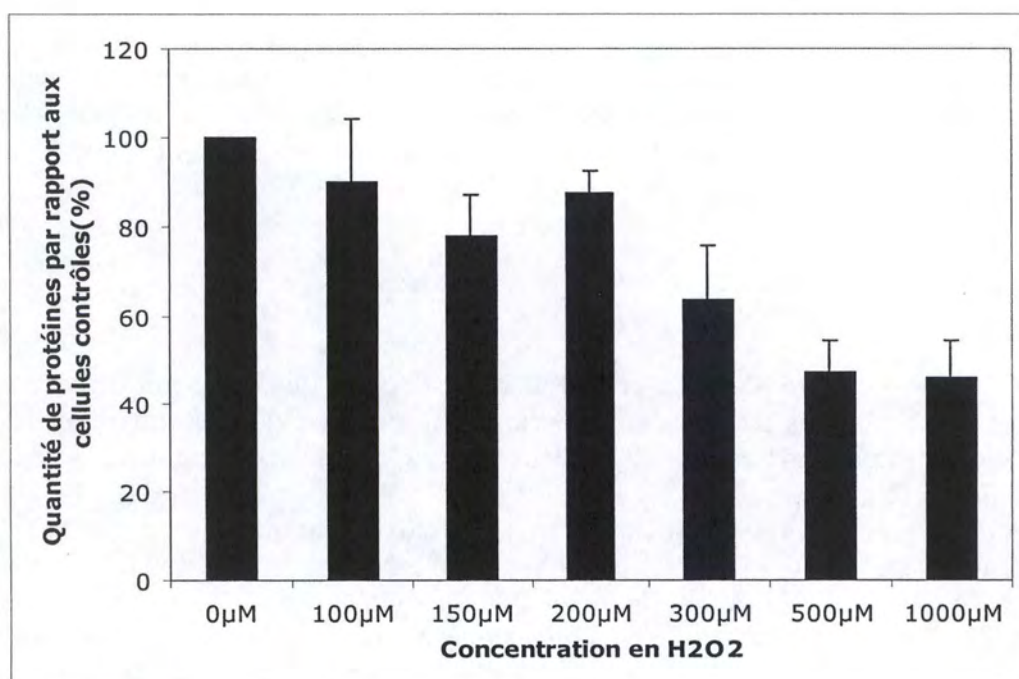
Pour cela, nous avons utilisé un test de cytotoxicité qui consiste au dosage de la concentration en protéines par la méthode du Folin. Des études précédemment réalisées au laboratoire, ont montré que la quantité de protéines dans une culture de fibroblastes IMR-90 est le reflet fidèle du nombre de cellules présentes dans la culture (Dumont *et al.*, 2000). Dans nos conditions, nos cellules ont été répiquées à une densité de 100.000 cellules par puits et ont été soumises à différentes doses d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ensuite, nous avons effectué un dosage protéique par la méthode du Folin 72 h après le stress.

### **Résultats**

Nous constatons que la quantité de protéines est inversement proportionnelle à la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En effet, à partir de la concentration de 300  $\mu$ M, on remarque que la mortalité cellulaire est apparemment supérieure à 30%. La mortalité réelle est probablement inférieure à cette valeur. En effet, les cellules contrôles ont eu l'occasion de se diviser entre le moment du stress et le moment du dosage protéique. Un accroissement de 15-20% de protéines cellulaires en un jour est couramment observé (de Magalhaes *et al.*, 2002). Suite à ces résultats, nous avons décidé de réaliser nos stress à une concentration de 200  $\mu$ M, ce qui correspond à une dose optimale n'impliquant pas une mortalité trop importante (figure III-1).

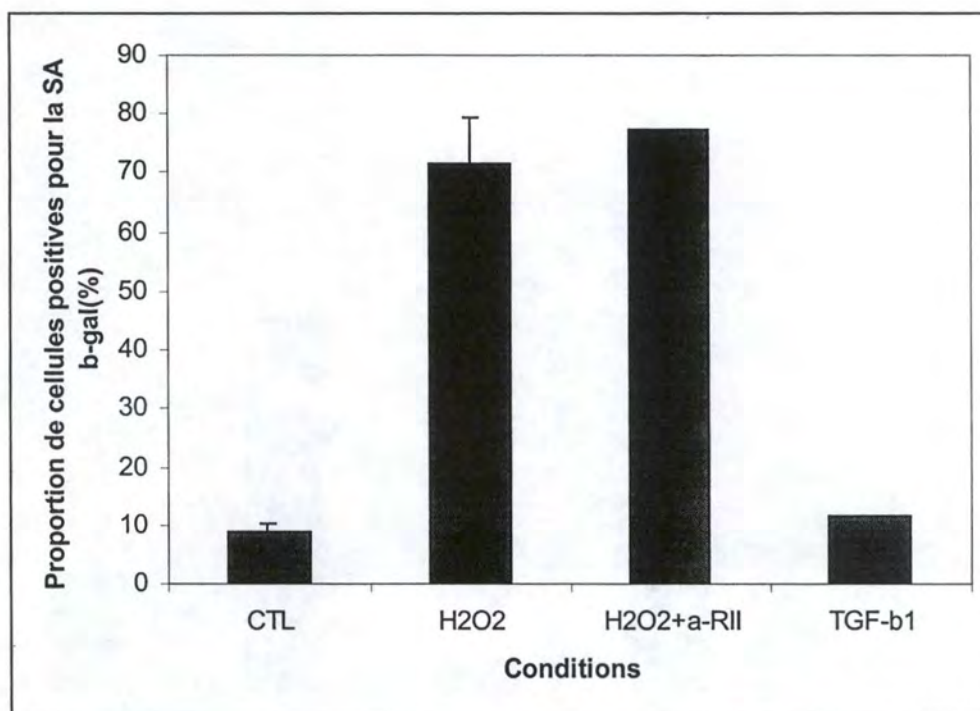
### **2. L'activité $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence**

### **Résultats**



**Figure III-1** : Courbe de mortalité cellulaire en fonction de concentrations croissantes en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Un stress de 2h sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été réalisé et les protéines cellulaires ont été dosées 72h après le stress. Les résultats sont exprimés en pourcentage de protéines par rapport à la quantité de protéines présentes chez les cellules contrôles.





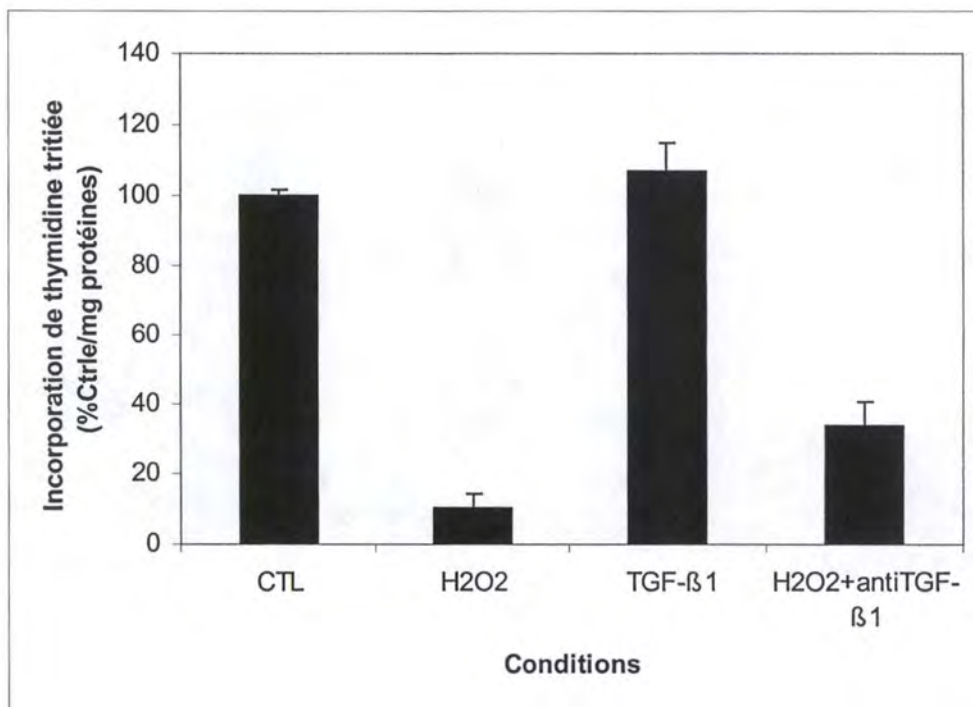
**Figure III-2 :** Proportion de cellules présentant l'activité S.A β-gal dans les différentes conditions testées.

CTL : cellules contrôles

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : cellules 72h après un stress sous 200μM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 2 h

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + a-RII : cellules 72h après un stress sous 200μM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 2 h + ajout d'un anticorps neutralisant du récepteur II du TGF-β1 (3 μg/ml)

TGF-β1 : cellules 72h après une stimulation au TGF-β1 (10ng/ml)



**Figure III-3** : Estimation du potentiel prolifératif des fibroblastes IMR-90 hTERT dans différentes conditions testées par mesure de l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN rapporté à la quantité de protéines cellulaires. La thymidine tritiée est ajoutée dans le milieu cellulaire juste après le stress. L'incorporation se fait pendant 24h.

CTL : cellules contrôles

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : cellules 72h après un stress sous 200 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 2 h

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + anti TGF-β1 : cellules 72h après un stress sous 200µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 2 h avec ajout d'un anticorps (5µg/ml) neutralisant le TGF-β1

TGF-β1 : cellules 72h après une stimulation au TGF-β1 (10ng/ml)



La figure III-2 montre la proportion de cellules positives pour l'activité S-A  $\beta$ -gal pour les différentes conditions testées. Dans le cas des cellules IMR-90 hTERT soumises à un stress à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  (200  $\mu\text{M}$ ) pendant 2 h, nous constatons une augmentation d'un facteur 7 par rapport aux cellules contrôles. Par contre, la proportion de cellules exprimant l'activité S-A  $\beta$ -gal est moins élevée chez les cellules soumises à une stimulation au TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml). Afin de vérifier si le TGF- $\beta$ 1 est impliqué dans l'apparition de ce biomarqueur chez les IMR-90 hTERT en SIPS induite par l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , nous avons neutralisé le TGF- $\beta$ 1 grâce à un anticorps bloquant le récepteur II du TGF- $\beta$ 1. Nous pouvons remarquer que l'augmentation de la proportion de cellules positives pour l'activité S-A  $\beta$ -gal chez les IMR-90 hTERT soumises à un stress avec ajout de cet anticorps neutralisant est similaire à celle des cellules en SIPS induite par l' $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### Discussion

Les résultats obtenus démontrent une augmentation de la proportion de cellules positives pour l'activité S-A  $\beta$ -gal chez les cellules IMR-90 hTERT soumises à un stress sous 200  $\mu\text{M}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Il semblerait donc que les fibroblastes de souche IMR-90 immortalisés par la sous-unité catalytique de la télomérase sont capables de rentrer en SIPS. Dans le cas de la stimulation au TGF- $\beta$ 1, cette augmentation est beaucoup moins marquée. Ces données sont différentes de celles observées pour les cellules IMR-90 normales (Fripiat *et al.*, 2000). De plus, la neutralisation du TGF- $\beta$ 1 par un anticorps n'empêche pas une augmentation de la proportion de cellules positives pour l'activité S-A  $\beta$  gal chez les cellules IMR-90 hTERT soumises à un stress sous 200  $\mu\text{M}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$ .

En conclusion, il semblerait donc que le TGF- $\beta$ 1 éventuellement libéré suite à un stress à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  n'est pas responsable de l'apparition de l'activité S-A  $\beta$ -gal chez les cellules IMR-90 hTERT alors que chez les cellules IMR-90 normales, le TGF- $\beta$ 1 permet, via l'activation de  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$ , l'induction de ce biomarqueur de la sénescence. On peut donc supposer que les mécanismes amenant ces biomarqueurs sont différents chez les cellules IMR-90 hTERT en SIPS induit par l' $\text{H}_2\text{O}_2$  par rapport aux IMR-90 normales.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié un second biomarqueur de la SIPS.

### 3. Estimation du potentiel prolifératif par mesure de l'incorporation de thymidine tritiée

Nous savons déjà que les cultures de fibroblastes de souche IMR-90 soumis à un stress de 150  $\mu\text{M}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$  pendant 2 heures voient leur capacité de croissance réduite pendant de nombreux jours. D'une part, nous avons voulu vérifier si la capacité de prolifération des cellules IMR-90 hTERT est également affectée lorsqu'elles sont soumises à un stress unique d' $\text{H}_2\text{O}_2$ . D'autres part, sachant que le TGF- $\beta$ 1 est connu pour ces effets antiprolifératifs chez les fibroblastes normaux (Fripiat *et al.*, 2001), nous nous sommes intéressés au rôle de celui-ci dans l'apparition de ce second biomarqueur chez les cellules IMR-90 hTERT.



## Résultats

L'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN rapportée à la quantité de protéines permet d'estimer le potentiel prolifératif cellulaire dans les différentes conditions testées. La quantité de thymidine tritiée incorporée par les fibroblastes contrôles représente 100%. Les résultats représentés par la figure III-3 montrent une diminution très importante du potentiel prolifératif chez les cellules IMR-90 hTERT soumises à un stress sous 200  $\mu$ M avec ou sans neutralisation du TGF- $\beta$ 1 par rapport aux cellules contrôles. En effet, on observe des diminutions respectives de 90% et de 66%. En ce qui concerne les cellules stimulées au TGF- $\beta$ 1, leur incorporation de thymidine tritiée est similaire à celle des cellules contrôles (Figure III-3).

## Discussion

Ces résultats confirment que les cultures de cellules IMR-90 hTERT soumises à un stress ressemblent, tout comme le suggérait la proportion de fibroblastes positifs pour la S-A  $\beta$ -gal, à une culture de cellules IMR-90 normales soumises à un stress sous  $H_2O_2$  où une majorité de la population cellulaire présente un arrêt du cycle cellulaire.

Ces résultats corrélerent les données relatives à la S-A  $\beta$ -gal mais sont toutefois très différents de ceux observés pour les cellules IMR-90 normales.

## 4. Niveau d'expression de p21<sup>Waf-1</sup>

Un niveau d'expression élevé de p21<sup>Waf-1</sup> est une caractéristique importante des cellules entrées en SIPS. Nous avons choisi la technique du Western-Blot afin de vérifier la surexpression de p21<sup>Waf-1</sup> chez les cellules IMR-90 hTERT soumises à différentes conditions, à savoir, un stress sous  $H_2O_2$  avec ou sans agent neutralisant du TGF- $\beta$ 1 ou à une stimulation au TGF- $\beta$ 1.

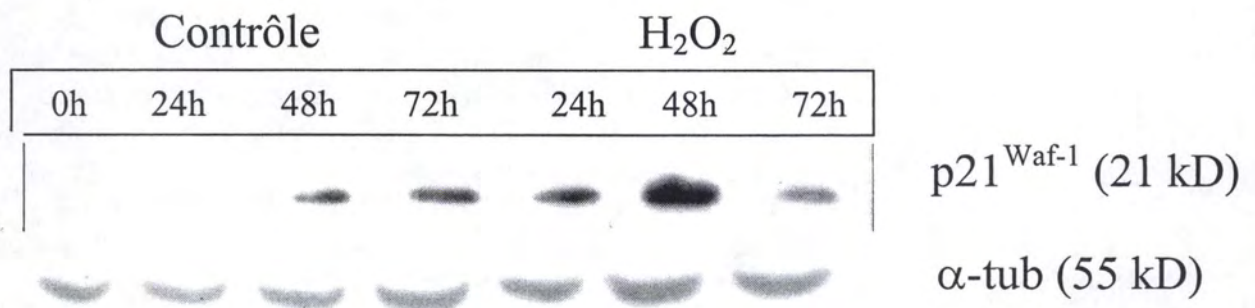
## Résultats

Le Western-blot réalisé pour détecter p21<sup>Waf-1</sup> chez les cellules IMR-90 hTERT soumises à un stress montre que la quantité de cette protéine est fortement augmentée à 24h et 48h après le stress par rapport aux cellules contrôles (Figure III-4). Il n'y a pas d'augmentation de la quantité de p21<sup>Waf-1</sup> chez les cellules IMR-90 hTERT stimulées au TGF- $\beta$ 1 par rapport aux cellules contrôles (Figure III-5). Une augmentation de la quantité de p21<sup>Waf-1</sup> est observée chez les cellules IMR-90 hTERT soumises à un stress sous 200  $\mu$ M et dont l'action du TGF- $\beta$ 1 a été neutralisée grâce à un anticorps dirigé contre le récepteur II du TGF- $\beta$ 1 (Figure III-6).

## Discussion

Etant donné que l'augmentation de quantité de p21<sup>Waf-1</sup> a lieu chez les cellules stressées avec ou sans neutralisation du TGF- $\beta$ 1 éventuellement sécrété, il semblerait que



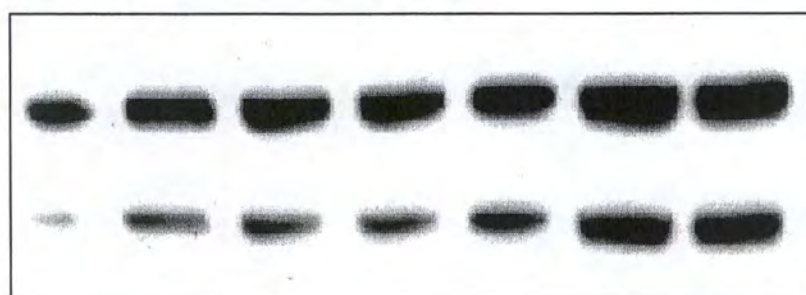


**Figure III-4** : Quantité relative de la protéine p21<sup>Waf-1</sup> chez des fibroblastes IMR-90 hTERT soumis à un stress sous 200μM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant deux heures. Le niveau d'expression de p21<sup>Waf-1</sup> a été déterminé à 24h, 48h, 72h après le stress.

**A.**

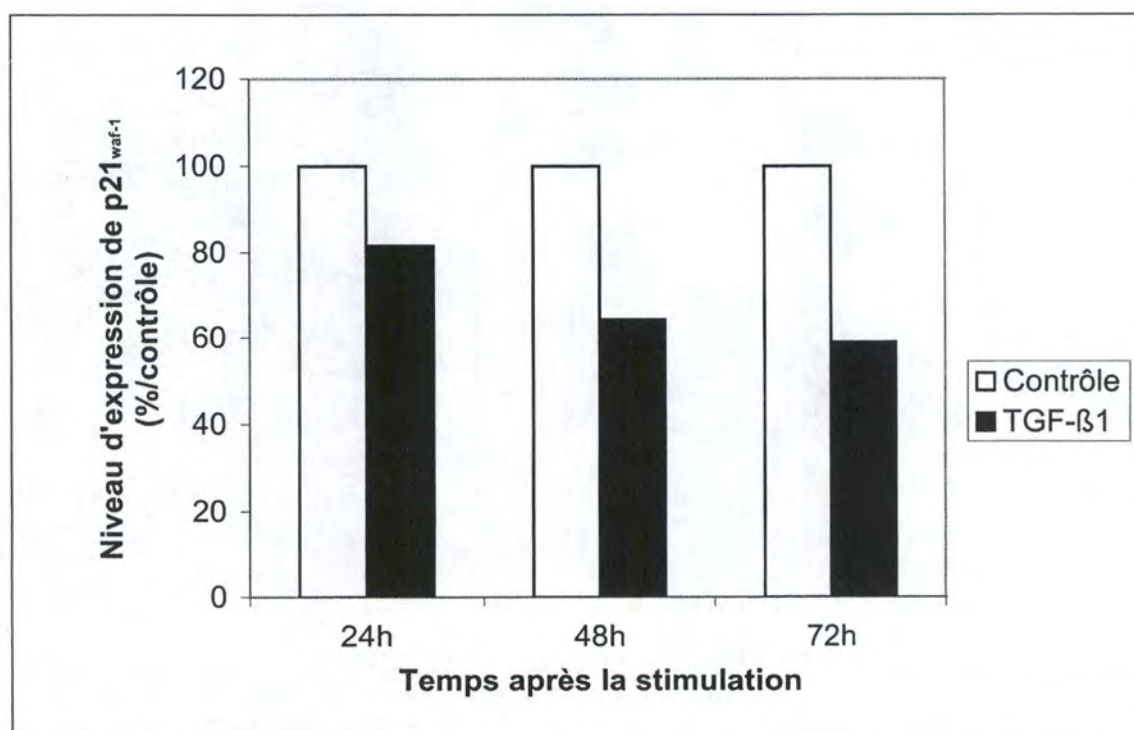
**Contrôle                      TGF- $\beta$ 1**

0h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
----	-----	-----	-----	-----	-----	-----



**p21<sup>waf-1</sup> (21kD)**  
 **$\alpha$ -tub (55kD)**

**B.**

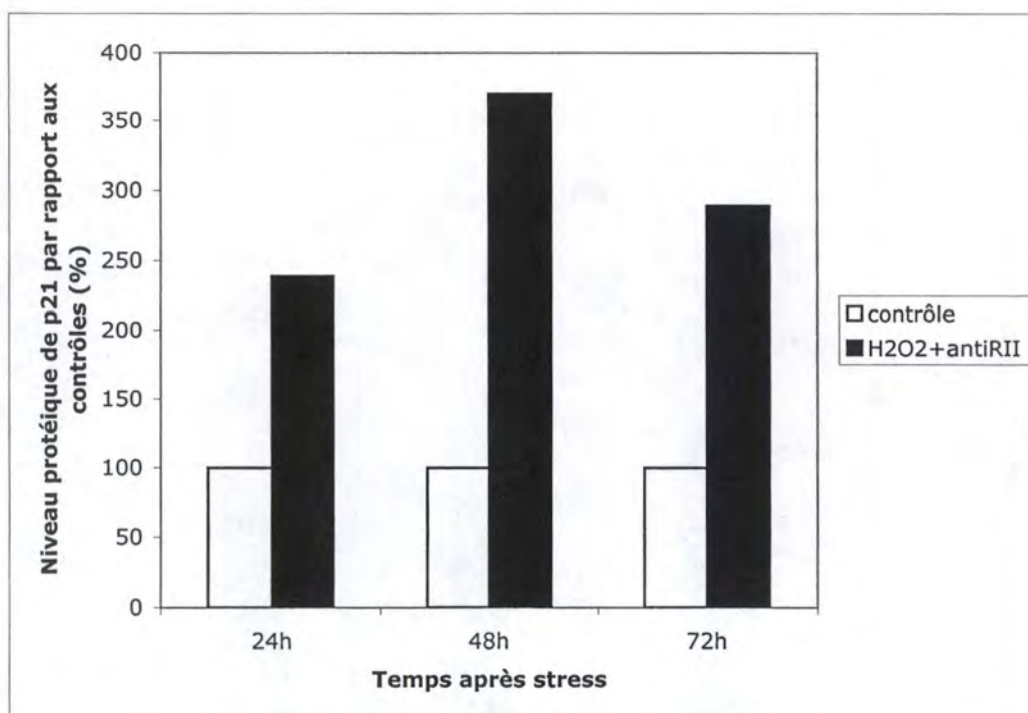
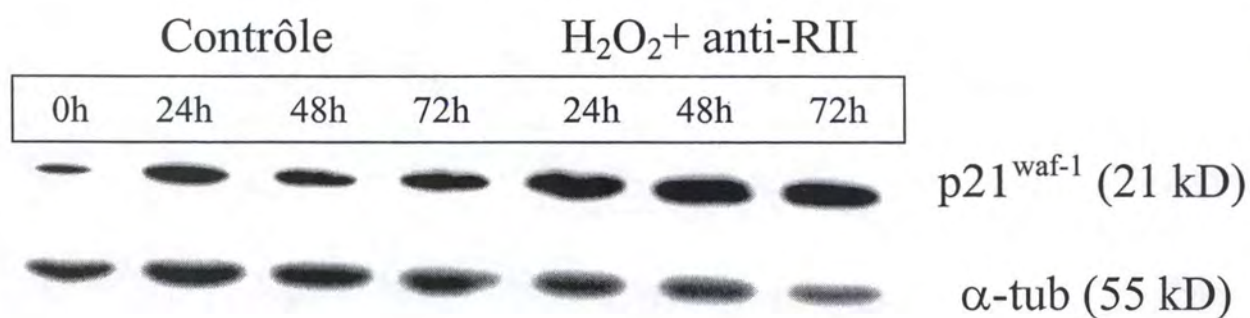


**Figure III-5** : Quantité relative de la protéine p21<sup>waf-1</sup> chez les cellules IMR-90 hTERT à différents temps après stimulation avec du TGF- $\beta$ 1 (10ng/ml).

**A** : Western blot ( $\alpha$ -tub = protéine de référence)

**B** : Quantification





**Figure III-6 :** Quantité relative de la protéine p21<sup>Waf-1</sup> chez des IMR-90 hTERT à différents temps après un stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec ajout d'un anticorps neutralisant le TGF-β1.

A. Western Blot (α-tub : protéine de référence)

B. Quantification

ce dernier n'est pas responsable de cette augmentation de quantité de p21<sup>Waf-1</sup>. Ces résultats confirment les résultats d'incorporation de thymidine tritiée observés chez les cellules IMR-90 hTERT.

Ces résultats confirment que lorsque l'on soumet les fibroblastes IMR-90 hTERT à un stress à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, l'apparition des biomarqueurs est identique aux cellules IMR-90 normales. Suite à un stress, il y a bien une surexpression de p21<sup>Waf-1</sup> entraînant un arrêt du cycle cellulaire et une augmentation de la proportion de cellules positives pour l'activité S.A β-gal. Par contre, des différences entre les deux types cellulaires sont observées lorsque l'on soumet les IMR-90 normales et IMR-90 hTERT à une stimulation au TGF-β1. Toutefois, les résultats obtenus lors de la stimulation des IMR-90 hTERT au TGF-β1 vont dans le même sens.

## **Seconde partie : Expression différentielle chez les fibroblastes IMR-90 hTERT**

### **1. Sénechips**

#### **A. Design du damier**

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons utilisé le damier appelé « sénechips » afin de comparer l'expression différentielle de gènes chez les fibroblastes IMR-90 hTERT soumis à différentes conditions.

La figure III-7 représente le design de la sénechips. Outre les spots constitués d'ADN trappeurs caractéristiques de l'étude d'expression de gènes qui est menée, on y retrouve d'autres spots particuliers.

Parmi ceux-ci, on distingue tout d'abord des **contrôles de fixation**. Ceux-ci permettent de s'assurer de la bonne fixation des ADN trappeurs au support fonctionnalisé lors du spotting.

On y retrouve ensuite des **contrôles d'hybridation positive**. Ils sont constitués de trappeurs non biotinylés et ont pour fonction de vérifier le bon déroulement de l'hybridation. Des ADN cibles biotinylées anti-complémentaires à ces trappeurs sont ajoutées à chaque solution d'hybridation.

Des **contrôles d'hybridation négative** sont également présents et ont pour fonction de vérifier l'absence de contamination de spotting.

Enfin, on trouve **3 standards internes** dont le rôle est primordial lors de la normalisation des données après quantification.

L'organisation spatiale des spots est très importante pour la quantification et l'analyse des résultats. En effet, chaque trappeur est spotté en triple et chaque région du damier contient des standards internes et des trappeurs pour des gènes de référence permettant d'effectuer respectivement la normalisation locale et globale des valeurs.

#### **B. Utilisation de la sénechips**



### **SeneChips (240 genes)**

**Characteristic:**

- 3 pins →
- 3 replicates/capture probes
- 30x30=900 spots (soit 300 samples)
- 13,5 X 13,5 mm

- =Positive Hybridization Control
- =Negative Hybridization Control
- =Negative Detection Control
- =HouseKeeping gene
- =Internal Standard

Conc curve +Detectio

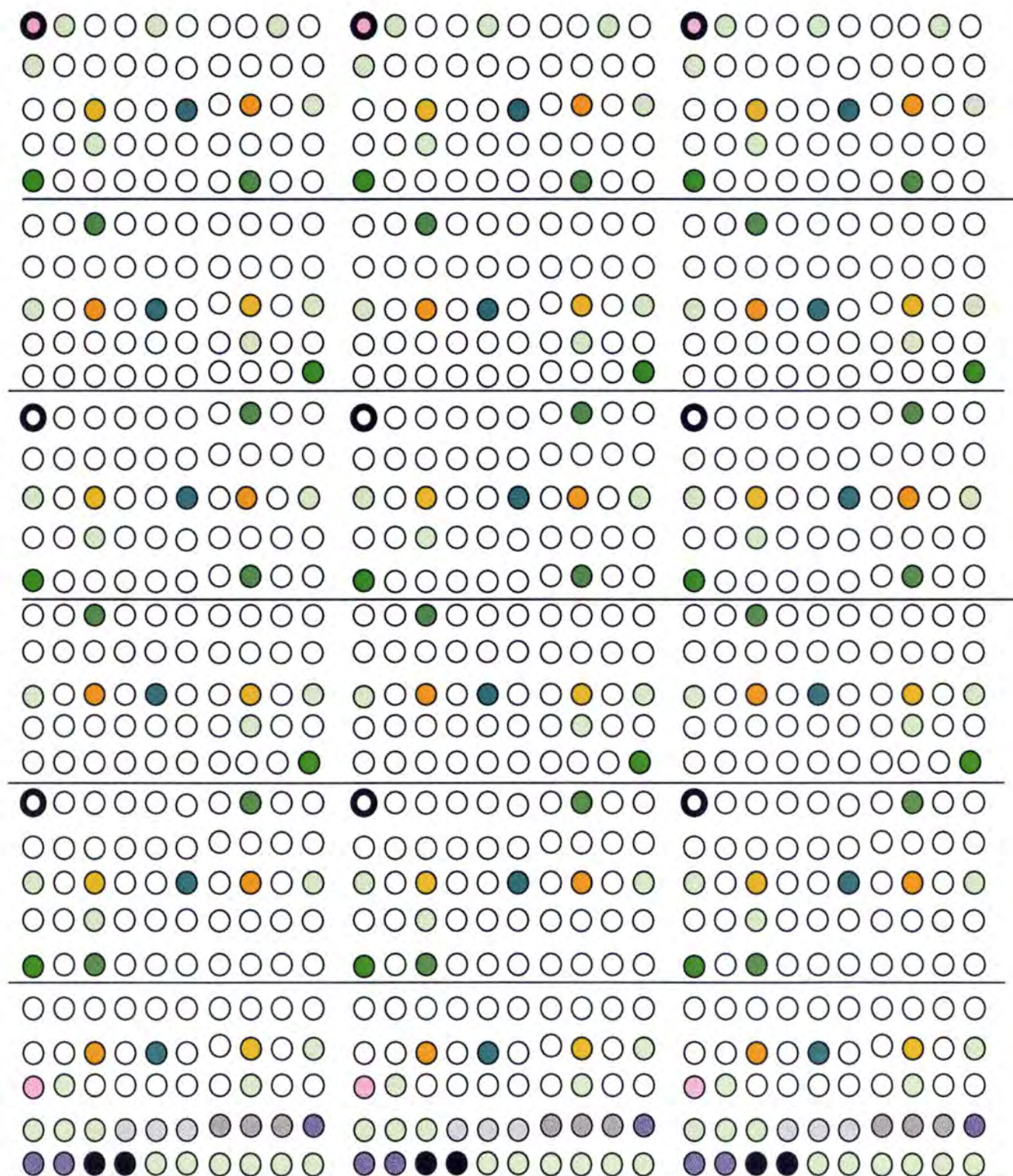
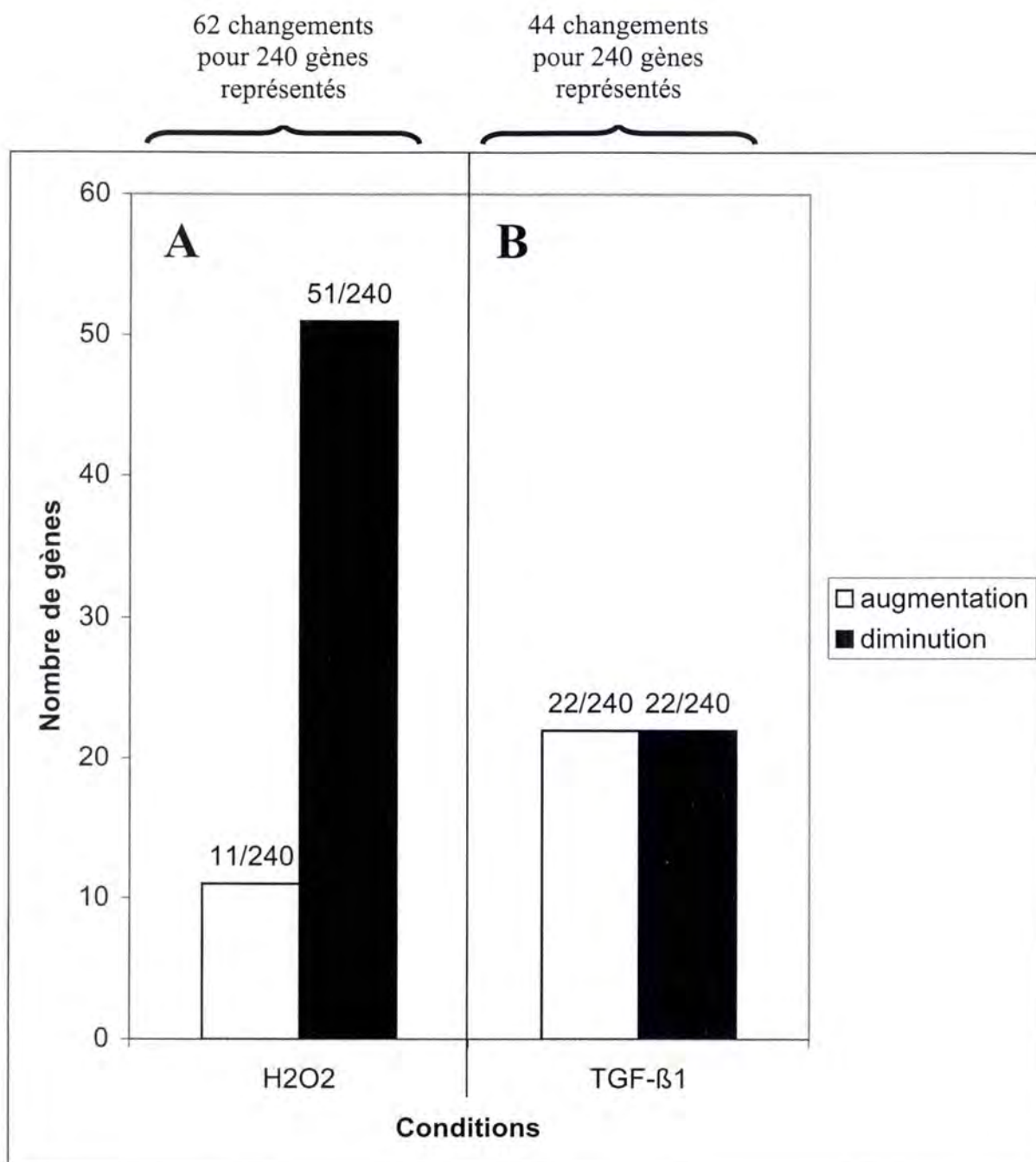


Figure III-7 : Design de la sénéchips



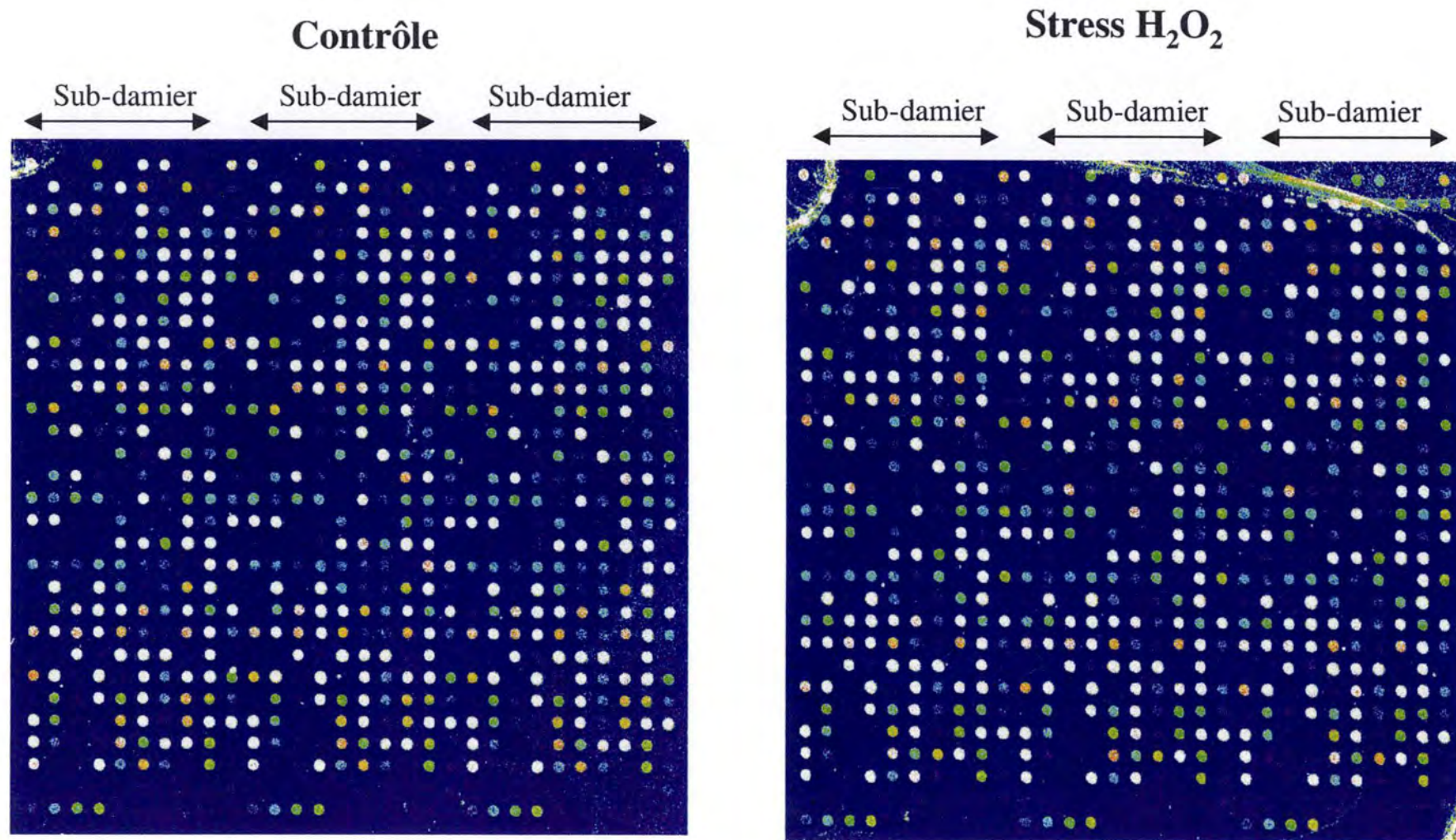
**Figure III-9** : Nombre de gènes dont la quantité de transcrits varie chez les cellules IMR-90 hTERT à 72h après un stress sous 200μM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 2h **(A)**, ou 72h après une stimulation au TGF-β1 (10ng/ml) **(B)**.

En blanc : Gènes dont la quantité de transcrits augmente.

En noir : Gènes dont la quantité de transcrits diminue.

Le damier représente 240 gènes.





**Figure III.8 a:** Résultats obtenus avec un gain 100 après une nuit d'hybridation de l'ADN complémentaires biotinylés (0,5µg) issus de la transcription inverse d'ARN messagers purifiés de fibroblastes IMR-90 hTERT contrôles et de fibroblastes IMR-90 hTERT à 72h après un stress sous 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 2 heures.



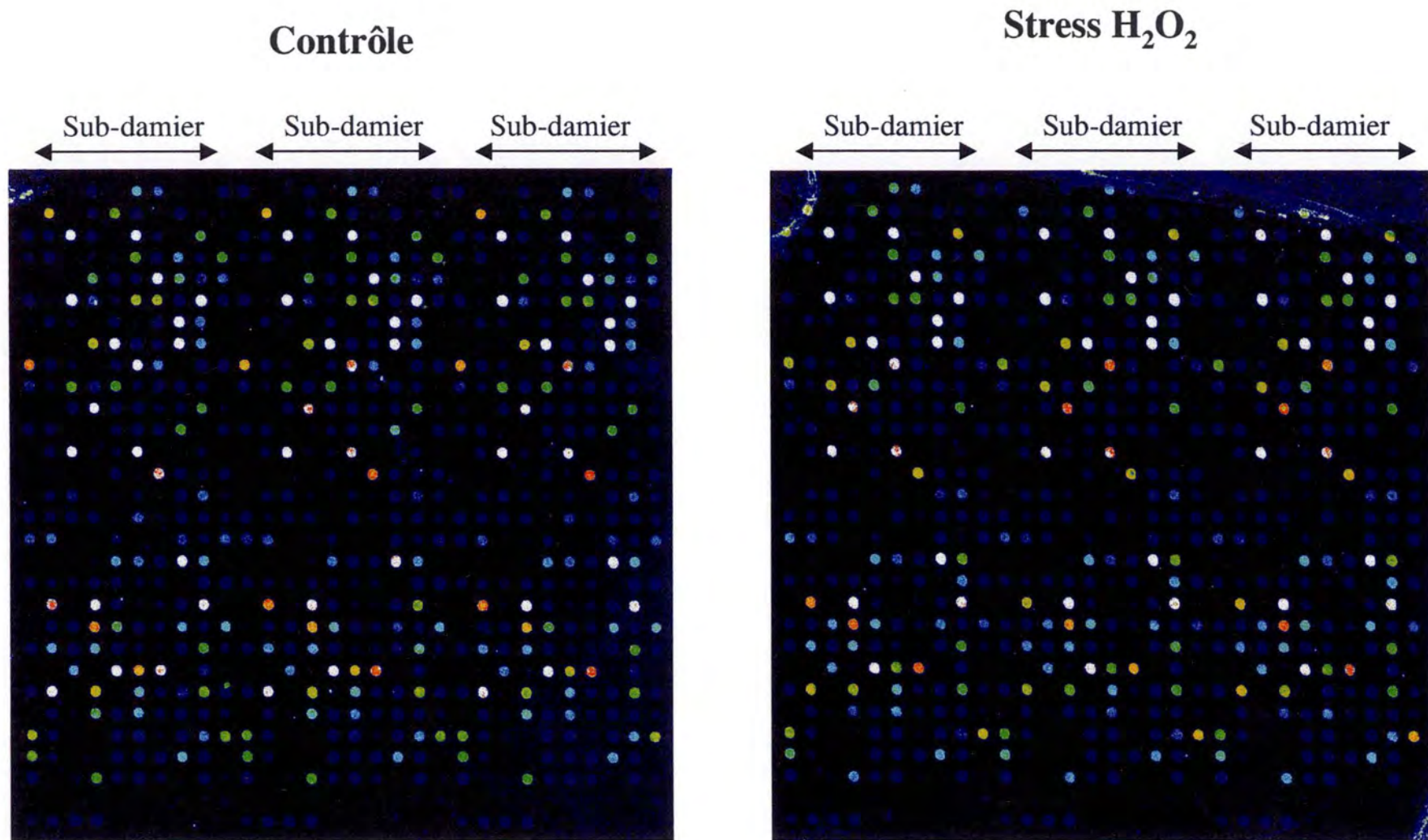


Figure III.8 b: Résultats obtenus avec un gain 70 après une nuit d'hybridation d'ADN complémentaires biotinylés (0,5µg) issus de la transcription inverse d'ARN messagers purifiés de fibroblastes IMR-90 hTERT contrôles et de fibroblastes IMR-90 hTERT à 72h après un stress sous 200 µM  $H_2O_2$  pendant 2 heures.



**Figure III.8 c:** Résultats obtenus avec un gain 50 après une nuit d'hybridation d'ADN complémentaires biotinylés (0,5µg) issus de la transcription inverse d'ARN messagers purifiés de fibroblastes IMR-90 hTERT contrôles et de fibroblastes IMR-90 hTERT à 72h après un stress sous 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 2 heures. L'isolation d'ARNm a été réalisée 72 heures après le stress. Scanning au gain 50.0



Afin d'étudier l'expression différentielle chez les fibroblastes IMR-90 hTERT nous avons, 72 h après le stress sous 200  $\mu\text{M}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$  ou après 72h de stimulation au TGF- $\beta 1$  (10 ng/ml), purifié l'ARNm de nos cellules selon le mode opératoire décrit au point 8.1. de la section matériels et méthodes.

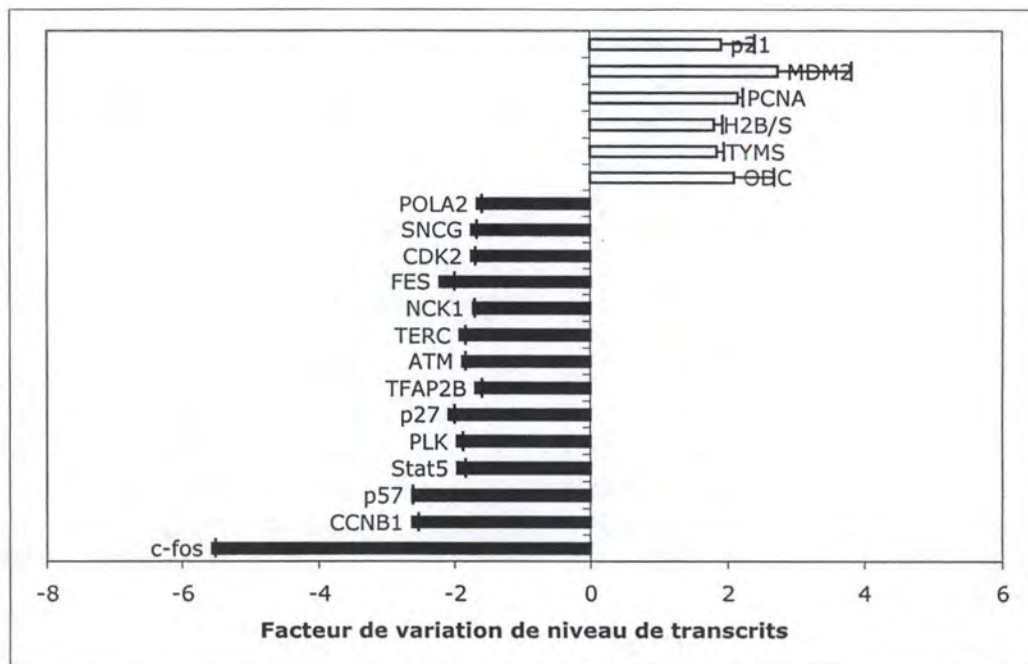
Ensuite nos échantillons d'ARNm ont été rétro-transcrits. Au laboratoire, nous avons montré qu'une quantité de l'ordre de 0.5 $\mu\text{g}$  d'ARNm est optimale pour l'étape de rétro-transcription. Les ADN cibles ainsi obtenus, sont déposés sur chaque damier durant une nuit en vue de les hybrider avec leur trappeur anticomplémentaire. Ensuite, les ADN cibles sont mis en évidence par des anticorps anti-biotine couplés à un fluorochrome, la cyanine-3. Cette dernière est détectée à l'aide d'un scanner confocal. On obtient ainsi une image digitalisée des spots dont l'intensité est représentée par une échelle de couleurs artificielles. Chaque damier a été scanné à trois gains différents : 100, 70 et 50 afin de pouvoir détecter à la fois les transcrits présents en faible et en forte quantité. Après avoir scanné les lames, les images obtenues sont quantifiées avec le programme « IMAGEGENE ». Ce dernier permet de déterminer la moyenne des intensités de chaque pixel à l'intérieur d'un spot. Les valeurs obtenues par l'intermédiaire de ce programme vont permettre de déterminer la variation d'expression de gènes d'une situation test par rapport à une situation contrôle. Pour chaque groupe de 3 spots correspondant à un gène, la moyenne des valeurs obtenues est réalisée. Pour la suite du traitement de données, seules les moyennes étant 2.5 x supérieures au bruit de fond sont considérées. Chaque valeur moyenne test est divisée par la valeur moyenne contrôle correspondant. Ce rapport est réalisé entre des valeurs correspondant à un même gène et ayant été obtenues pour des damiers ayant été scannés à un gain identique. Une normalisation de la transcription inverse, de l'hybridation et de la révélation est réalisée par l'intermédiaire des standards internes afin de réduire les possibles variations de ces étapes. Une seconde normalisation pour l'ensemble du damier est enfin réalisée par les « housekeeping gene » afin de réduire les variations biologiques entre les damiers. Les valeurs obtenues correspondent à des variations d'expression de gènes. Les valeurs supérieures à 1 correspondent à une augmentation de l'expression du gène considéré par rapport au contrôle. Les valeurs comprises entre 0 et 1 correspondent à une diminution d'expression de gène. La valeur de cette diminution est définie par l'inverse négative de la valeur de normalisation globale comprise entre 0 et 1.

#### B.1. Effet d'un stress à l' $\text{H}_2\text{O}_2$ (200 $\mu\text{M}$ ) sur l'expression de gènes chez les cellules IMR-90 hTERT

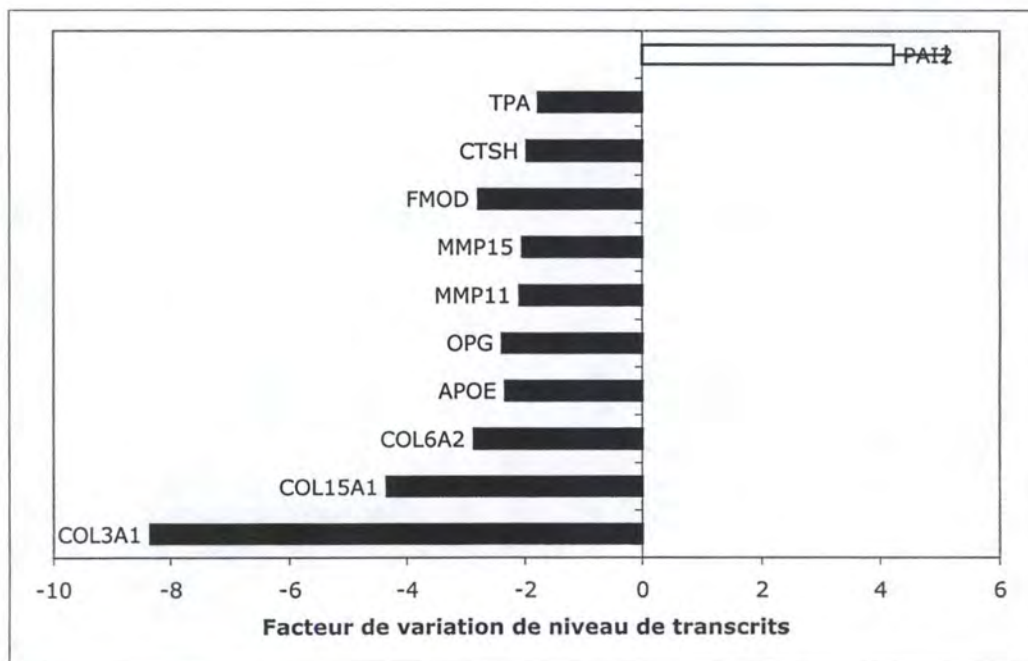
Les résultats obtenus après quantification et normalisation des résultats obtenus lors du scanning représentés par les figures III-8 a, b, c, suggèrent que 72 h après le stress sous  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 62 transcrits sont présents en quantité différente par rapport aux cellules IMR-90 hTERT contrôles (Figure III- 9). Parmi ceux-ci, 11 sont sujets à une augmentation de niveau alors que 51 autres sont sujets à une diminution de niveau. Un changement de quantité obtenu pour 62 transcrits sur 240 gènes représentés sur le damier n'est pas étonnant vu que ce damier représente principalement les gènes impliqués dans le cycle cellulaire et la réponse aux stress. Lors de l'analyse de nos résultats, nous avons décidé de classer les gènes étudiés selon leur fonction principale connue.

La figure III-10 représente les gènes impliqués dans le cycle cellulaire et dont l'expression varie après un stress sous  $\text{H}_2\text{O}_2$ .





**Figure III-10 :** Effet d'un stress à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  sous 200  $\mu\text{M}$  pendant 2 h sur la quantité de transcrits de gènes impliqués dans le cycle cellulaire et sa régulation chez des IMR-90 hTERT 72h après un stress.  
 Colonne blanche : gènes dont le niveau de transcrits augmente  
 Colonne noire : gènes dont le niveau de transcrits diminue



**Figure III-11 :** Effet d'un stress à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  sous 200 $\mu\text{M}$  pendant 2 h sur la quantité de transcrits de gènes impliqués dans la matrice extracellulaire chez des IMR-90 hTERT 72h après un stress.  
 Colonne blanche : gènes dont le niveau de transcrits augmente  
 Colonne noire : gènes dont le niveau de transcrits diminue



Nous observons que la cycline B1, la CDK 2 (cycline dépendante kinase 2) et l'ADN polymérase A2 sont réprimées chez les fibroblastes IMR-90 hTERT soumis à un stress. Ces gènes indispensables lors de la progression du cycle cellulaire, sont également réprimés chez les fibroblastes WI-38 sénescents (Cristofalo *et al.*, 1998)

D'autre part, p21<sup>Waf-1</sup>, dont nous avons préalablement montré une augmentation du niveau protéique chez les fibroblastes IMR-90 hTERT soumis à un stress, est également surexprimé au niveau ARNm.

L'ensemble de ces résultats est en concordance avec la diminution de potentiel prolifératif observé chez les cellules IMR-90 hTERT après un stress.

Enfin, notons que la sous-unité ARN de la télomérase, TERC, semble réprimée suite à un stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Des gènes de la matrice extracellulaire (MEC) voient également leur niveau d'expression varier (Figure III-11). Dans la littérature, des dégradations de la MEC suite à la surexpression de métalloprotéinases comme la collagénase mais aussi la gélatinase ont été observées lors du vieillissement de fibroblastes humains (Giacomoni et D'Alessio, 1996). Ces dégradations de la MEC contribueraient peut-être au remodelage de cette dernière et pourrait expliquer les changements morphologiques observés par Bayreuther chez les fibroblastes sénescents (Bayreuther *et al.*, 1988).

Chez les cellules IMR-90 hTERT soumises à un stress, 3 des 4 collagènes représentés sur le damier sont fortement réprimés. Il semblerait donc que la synthèse de la MEC soit moins importante suite à un stress chez les fibroblastes IMR-90 hTERT.

D'autre part, seul 2 des 11 métalloprotéinases (la MMP11 et MMP15) représentées sur le damier sont réprimées.

Suite à ces résultats, on peut émettre l'hypothèse que la balance synthèse/dégradation soit déséquilibrée en faveur du remodelage de la MEC chez les fibroblastes IMR-90 hTERT soumis à un stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Comme nous pouvons l'observer dans la figure III-12 et III-13, la plupart des gènes du damier, intervenant dans le système de défense et impliqués dans le processus d'inflammation, sont réprimés suite à un stress.

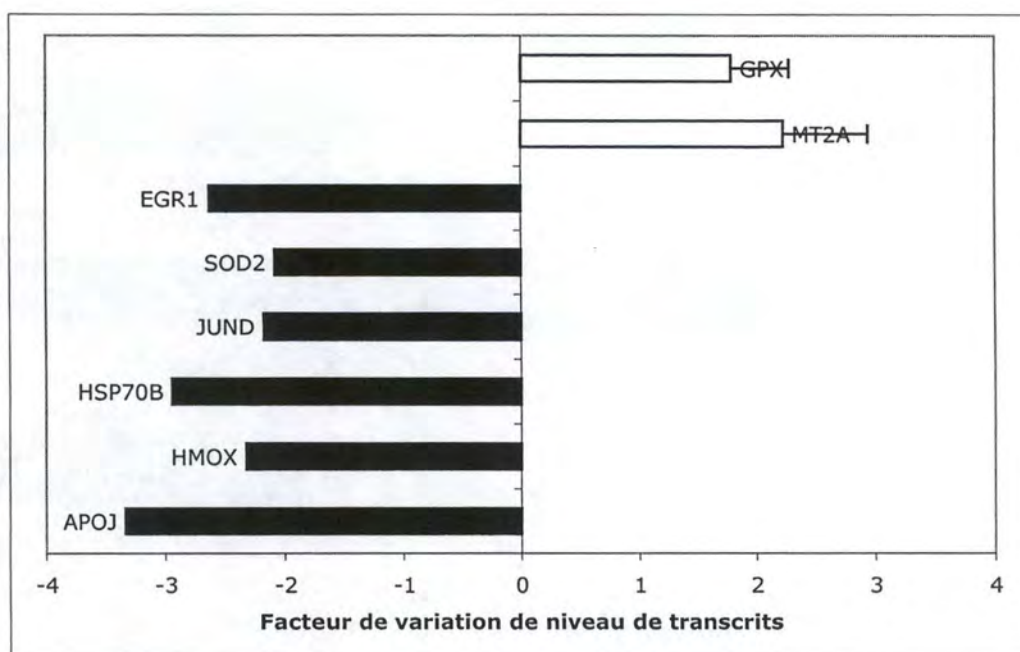
L'apo J (apolipoprotéine J), surexprimée chez les fibroblastes IMR-90 en SIPS sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fripiat *et al.*, 2001) et connue pour protéger les fibroblastes WI-38 des stress oxydatifs (Dumont *et al.*, 2002) semble réprimée chez les fibroblastes IMR-90 hTERT suite à un stress.

La SOD 2 (superoxyde dismutase 2) qui est un anti-oxydant est sous-exprimé chez les cellules hTERT. On a émis comme hypothèse que la sous-expression de la SOD 2 serait liée à une augmentation de la résistance face à l'apoptose. De plus, la SOD 2 est connue pour être impliquée dans l'apoptose dirigée par p53.

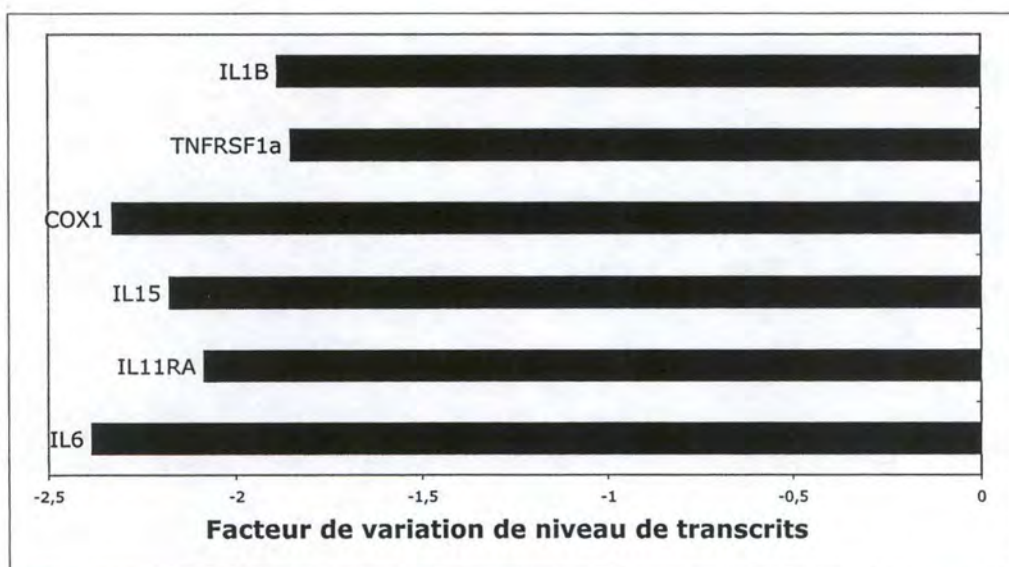
En conclusion, les mécanismes d'établissement de la SIPS chez les fibroblastes IMR-90 hTERT semblent être différents des fibroblastes IMR-90 normaux. En effet, nous n'observons plus, 72h après un stress, la surexpression de la fibronectine, ostéonectine, SM22 (transgéline), et de TGF- $\beta$ 1 chez les cellules IMR-90 hTERT. A ce stade, il serait intéressant d'étudier le profil d'expression des fibroblastes IMR-90 hTERT stimulés au TGF- $\beta$ 1 et ensuite de vérifier quelques résultats obtenus avec la senechips, par la technique de real-time RT-PCR.

## B.2. Effet d'une stimulation au TGF- $\beta$ 1 sur l'expression de gènes chez les cellules IMR-90 hTERT

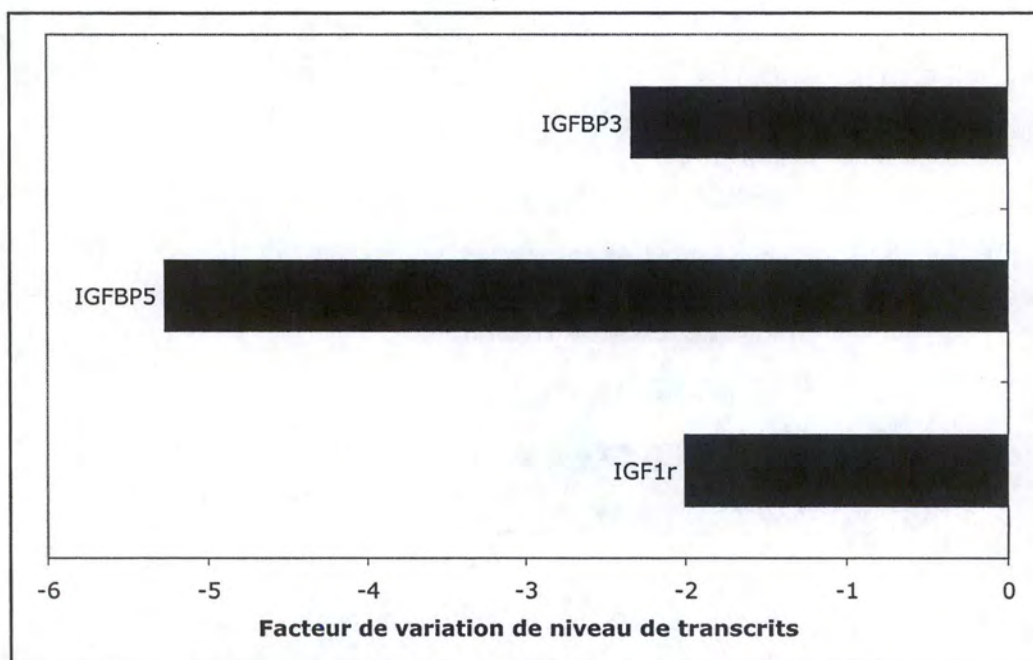




**Figure III-12** : Effet d'un stress à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  sous  $200 \mu\text{M}$  pendant 2 h sur le niveau de transcrits de gènes impliqués dans les systèmes de défense chez des IMR-90 hTERT 72h après un stress.  
 Colonne blanche : Gènes dont le niveau de transcrits augmente  
 Colonne noire : Gènes dont le niveau de transcrits diminue



**Figure III-13** : Effet d'un stress à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  sous  $200 \mu\text{M}$  pendant 2 h sur le niveau de transcrits de gènes qui sont impliqués dans l'inflammation chez les IMR-90 hTERT 72h après un stress.  
 Colonne blanche : Gènes dont le niveau de transcrits augmente  
 Colonne noire : Gènes dont le niveau de transcrits diminue

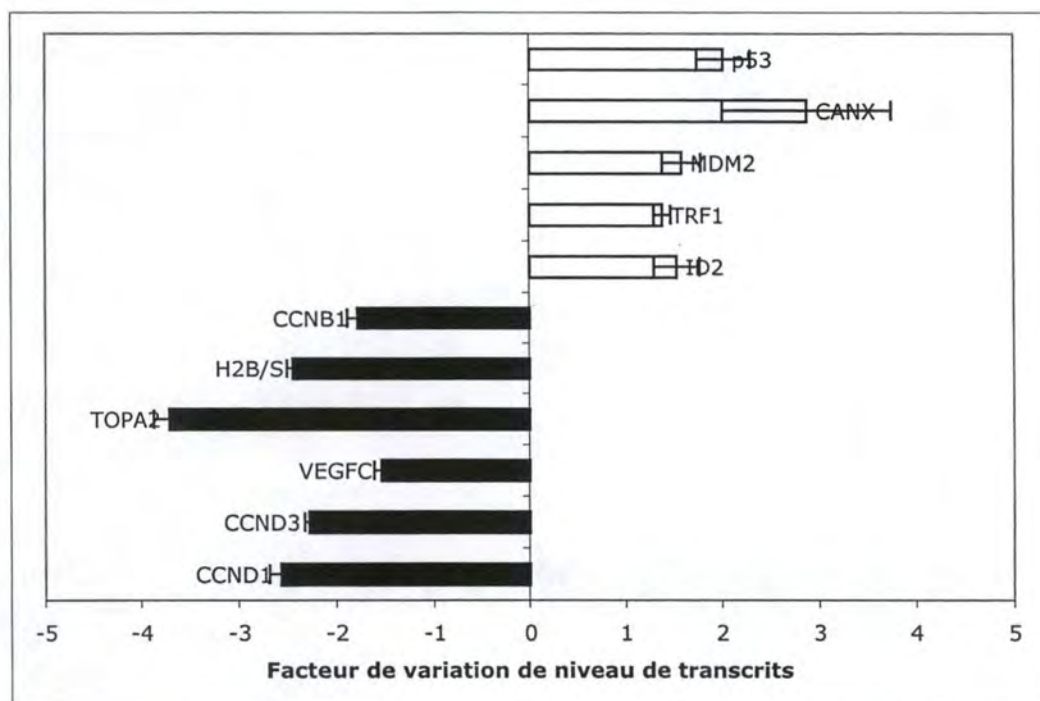


**Figure III-14** : Effet d'un stress à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  sous  $200\ \mu\text{M}$  pendant 2h sur la quantité de transcrits de gènes impliqués dans la résistance à l'apoptose chez des IMR-90 hTERT 72h après un stress.

Colonne blanche : gènes dont le niveau de transcrits augmente

Colonne noire : gènes dont le niveau de transcrits diminue

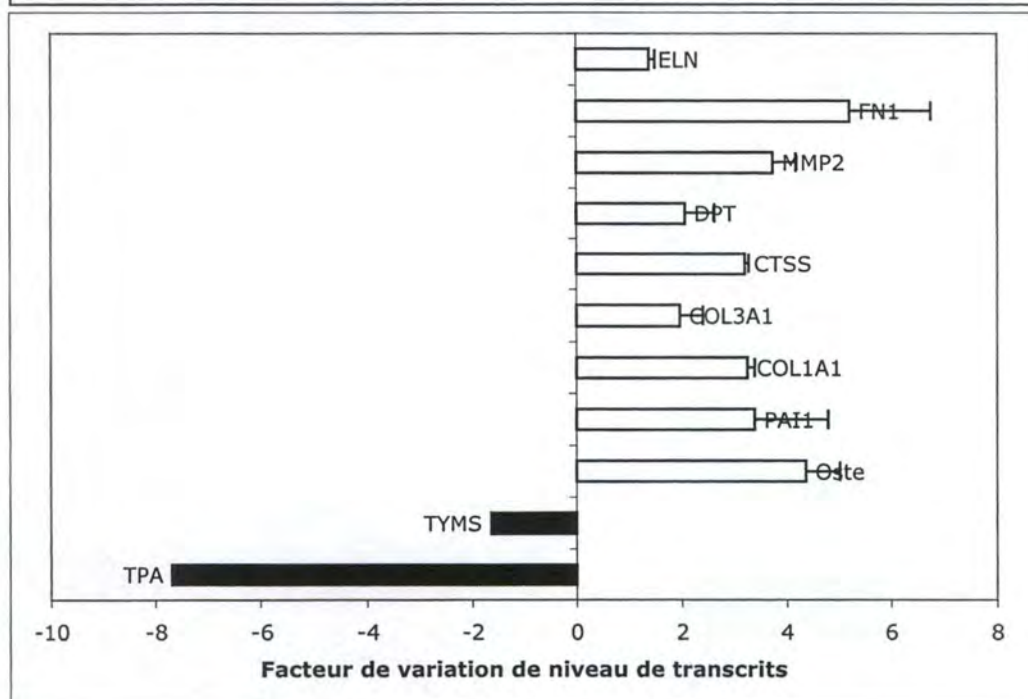




**Figure III-15** : Effet d'une stimulation au TGF- $\beta$ 1 sur la quantité de transcrits de gènes impliqués dans le cycle cellulaire et sa régulation chez des IMR-90 hTERT 72h après la stimulation.

Colonne blanche : gènes dont le niveau de transcrits augmente

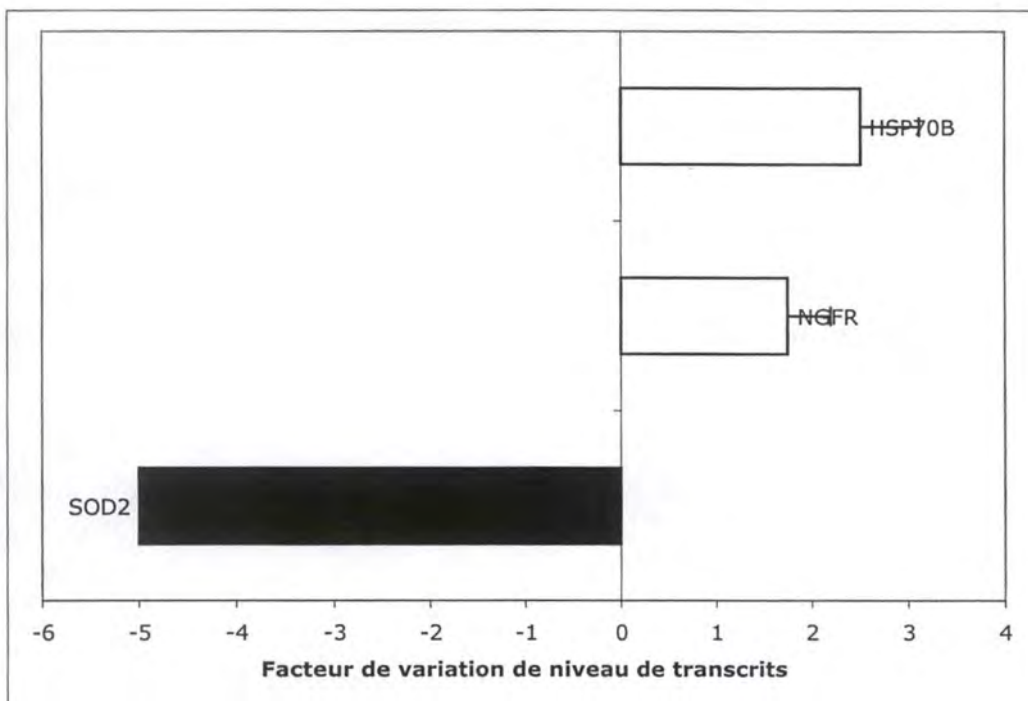
Colonne noire : gènes dont le niveau de transcrits diminue



**Figure III-16** : Effet d'une stimulation au TGF- $\beta$ 1 sur la quantité de transcrits de gènes impliqués dans la matrice extracellulaire chez des IMR-90 hTERT 72h après la stimulation.

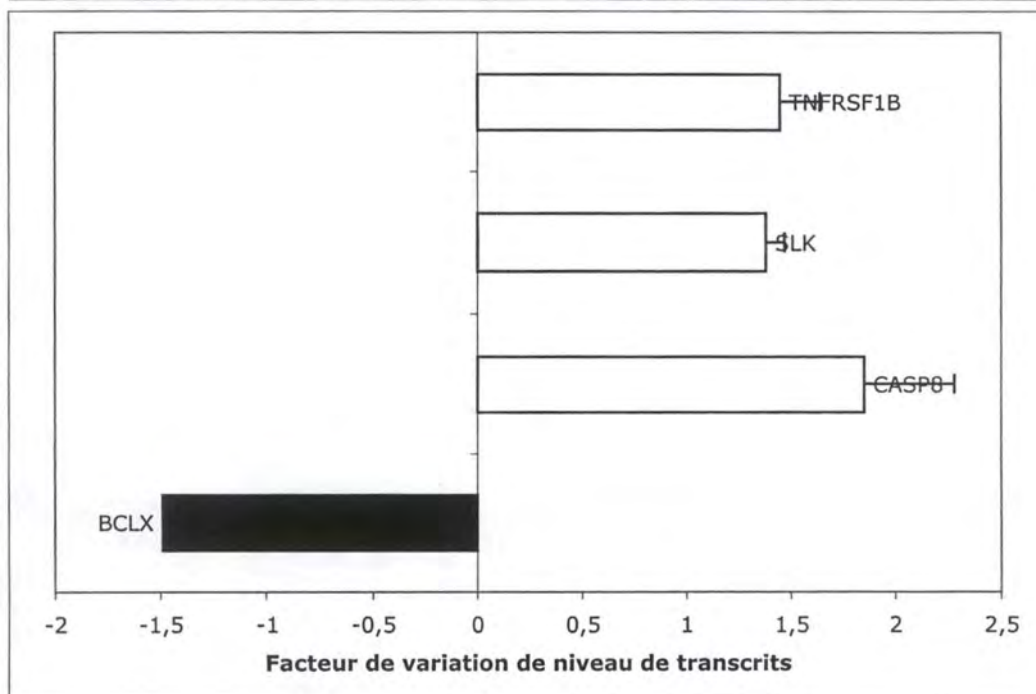
Colonne blanche : gènes dont le niveau de transcrits augmente

Colonne noire : gènes dont le niveau de transcrits diminue



**Figure III-17** : Effet d'une stimulation au TGF- $\beta$ 1 sur la quantité de transcrits de gènes impliqués dans les systèmes de défense chez des IMR-90 hTERT 72h après la stimulation.

Colonne blanche : gènes dont le niveau de transcrits augmente  
Colonne noire : gènes dont le niveau de transcrits diminue



**Figure III-18** : Effet d'une stimulation au TGF- $\beta$ 1 sur la quantité de transcrits de gènes impliqués dans l'apoptose chez des IMR-90 hTERT 72h après la stimulation.

Colonne blanche : gènes dont le niveau de transcrits augmente  
Colonne noire : gènes dont le niveau de transcrits diminue



La proportion de gènes présentant une expression différentielle est moins importante chez les cellules IMR-90 hTERT stimulées au TGF- $\beta$ 1 que chez les cellules stressées. En effet, 44 gènes voient leur expression varier dont une moitié est réprimée et l'autre surexprimée (Figure III-9).

Comme nous l'avons montré précédemment, une stimulation au TGF- $\beta$ 1 n'entraîne pas d'arrêt du cycle cellulaire chez les fibroblastes IMR-90 hTERT. Le fait que la quantité de p21<sup>Waf-1</sup> n'augmente pas après stimulation, en serait l'explication. Nous pouvons également constater que le niveau d'ARNm de plusieurs cyclines (CCND1, CCND3, CCNB1), est fortement diminué après la stimulation. Les cyclines D sont synthétisées dès le début de la phase G1 en réponse à un stimulus mitotique, leur accumulation est maximale en phase G1 tardive et leur dégradation intervient en début de phase S (Grana et Reddy., 1995). Les cyclines B, quant à elles, sont actives uniquement durant la phase M. On peut dès lors se demander si nos cellules, au moment de l'isolation d'ARNm, ne se trouvaient pas principalement en phase de synthèse de l'ADN (phase S). D'autre part, le facteur de transcription p53, qui peut également jouer un rôle de « tumor suppressor » en empêchant la transcription de certains gènes impliqués dans le cycle cellulaire, voit son niveau d'ARNm augmenter. Toutefois, notons que le régulateur de p53, MDM2 voit également son niveau d'expression augmenté ce qui pourrait expliquer que la quantité de p21<sup>Waf-1</sup> n'est pas augmentée (Figure III-14).

En ce qui concerne les gènes de la MEC, le niveau d'ARNm de l'ostéonectine et de la fibronectine augmentent. Suite à la stimulation avec le TGF- $\beta$ 1, le niveau d'ARNm de certains collagènes augmente ce qui diffère des conditions de stress où il était diminué, ce qui suggère que les deux traitements génèrent des phénotypes différents. La MPP 2 est surexprimée alors que suite à un stress, certaines métalloprotéases étaient réprimées (Figure III-15).

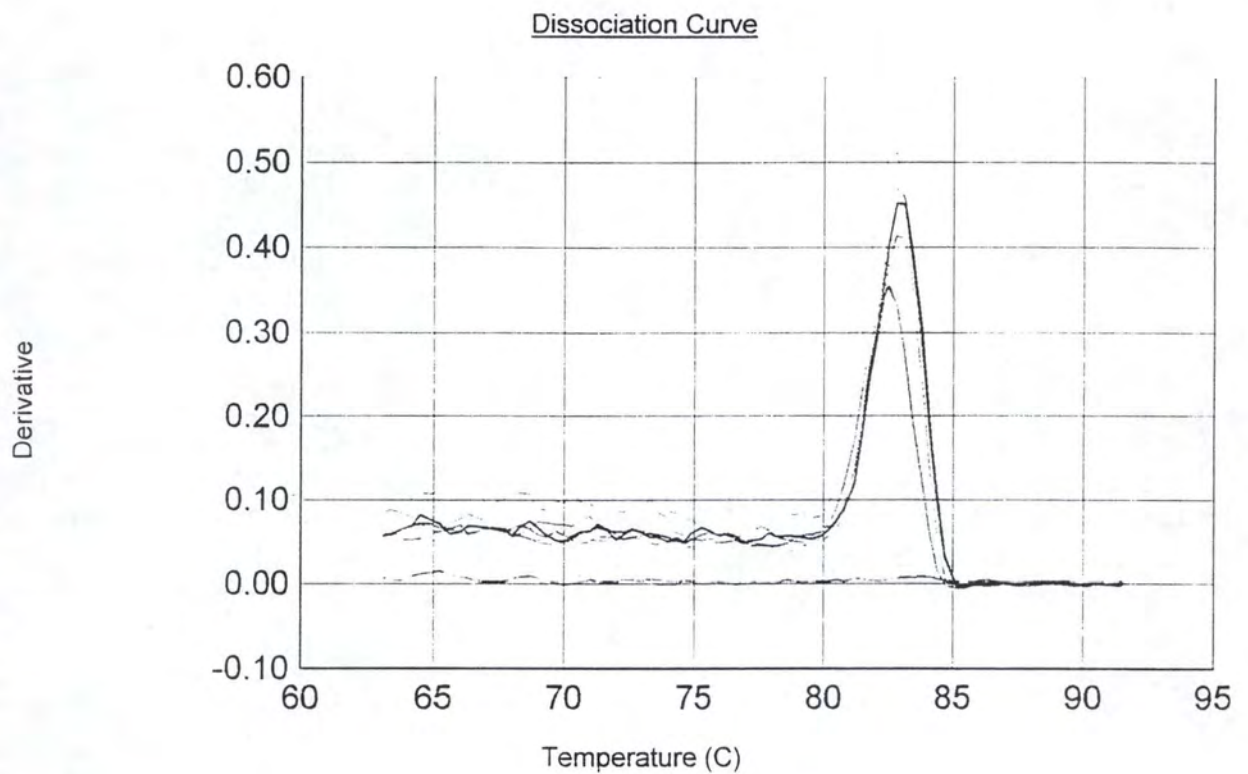
Dans la catégorie dite « système de défense », le nombre de gènes pour lesquels on observe une variation du niveau d'ARNm est très faible par rapport aux cellules soumises à un stress avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Parmi ces gènes, on retrouve la SOD 2 qui est fortement réprimée, tout comme après un stress (Figure III-16).

Les gènes BCLX et caspase 8 représentent la catégorie de gènes impliqués dans l'apoptose. La caspase 8 qui est un pro-apoptotique voit son expression à la hausse alors que BCLX, qui est un anti-apoptotique est réprimé. D'autre part, on peut constater que le niveau d'ARNm du récepteur II au TGF- $\beta$ 1 (TGFBRII) diminue d'un facteur 2,1 (Figure III-17).

## 2. Real-time RT-PCR

Au laboratoire, il a été mis en évidence que des fibroblastes IMR-90 soumis à un stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou stimulés au TGF- $\beta$ 1 surexprimaient l'Apo J, la fibronectine, l'ostéonectine, SM22 et le TGF- $\beta$ 1.

Afin de valider les résultats obtenus lors de l'hybridation sur damier de l'ADNc préalablement rétro-transcrits à partir d'ARNm issu des cellules IMR-90 hTERT stressées avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou stimulées au TGF- $\beta$ 1, nous avons décidé d'étudier le niveau d'ARNm de



**Figure III-19** : Courbe de dissociation permettant de vérifier la nature des amplicons. Le graphique représente la dérivée du signal de fluorescence générée par le SyBr-Green en fonction de la température. La courbe de dissociation montre un pic à la température de melting de l'amplicon.



ces 5 gènes ainsi que p21<sup>Waf-1</sup>, hTERT et deux gènes de références, GAPDH et RPL13 par la technique de RT-PCR en temps réel.

Rappelons que les résultats obtenus pour les cellules IMR-90 hTERT lors de l'utilisation du damier semble être différents de ceux obtenus pour les cellules IMR-90 normales. En effet, suite à un stress avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nous n'observons plus de surexpression de la fibronectine, de l'ostéonectine, de SM22, de l'Apo J et du TGF- $\beta$ 1 chez les cellules IMR-90 hTERT. p21<sup>Waf-1</sup> est par contre aussi surexprimée chez les cellules IMR-90 hTERT à 72 heures après stress. En ce qui concerne les fibroblastes IMR-90 hTERT stimulées au TGF- $\beta$ 1, elles présentent, tout comme les cellules IMR-90 normales, une augmentation du niveau d'ARNm de la fibronectine, de l'ostéonectine et de SM22 mais p21<sup>Waf-1</sup> et l'Apo J sont réprimés.

Afin de réaliser la quantification du niveau relatif des ARNm correspondant aux 9 gènes étudiés dans les différentes conditions, nous avons défini, pour chacun d'eux, un couple d'amorces (Tableau II-2 dans matériels et méthodes). Ensuite nous avons contrôlé la nature des produits amplifiés par RT-PCR en temps réel en réalisant des courbes de dissociation. L'une d'entre elles est représentée en guise d'exemple, à la figure III-19. Aucun pic correspondant à la formation de dimères d'amorces ou de produits aspécifiques n'a été observé.

#### a) Détermination des efficacités de PCR

Nous avons, pour chacun des gènes étudiés, établi une droite standard en réalisant une PCR en temps réel à partir d'une série de dilutions d'ADNc allant de 10<sup>-2</sup> à 10<sup>-4</sup>. La méthode de quantification utilisée pour traiter les résultats de PCR en temps réel (voir matériels et méthodes, au point 7.4) nécessite de connaître l'efficacité d'amplification pour chacun des gènes étudiés.

L'efficacité d'amplification est déterminée grâce à la pente de l'équation de la droite standard. En effet, nous pouvons observer que les pentes des droites standard obtenues pour les gènes de références (RPL 13 et GAPDH) et pour chaque gènes d'intérêt sont similaires (Figure III-20). Les efficacités d'amplification sont toutes de l'ordre de 1.8.

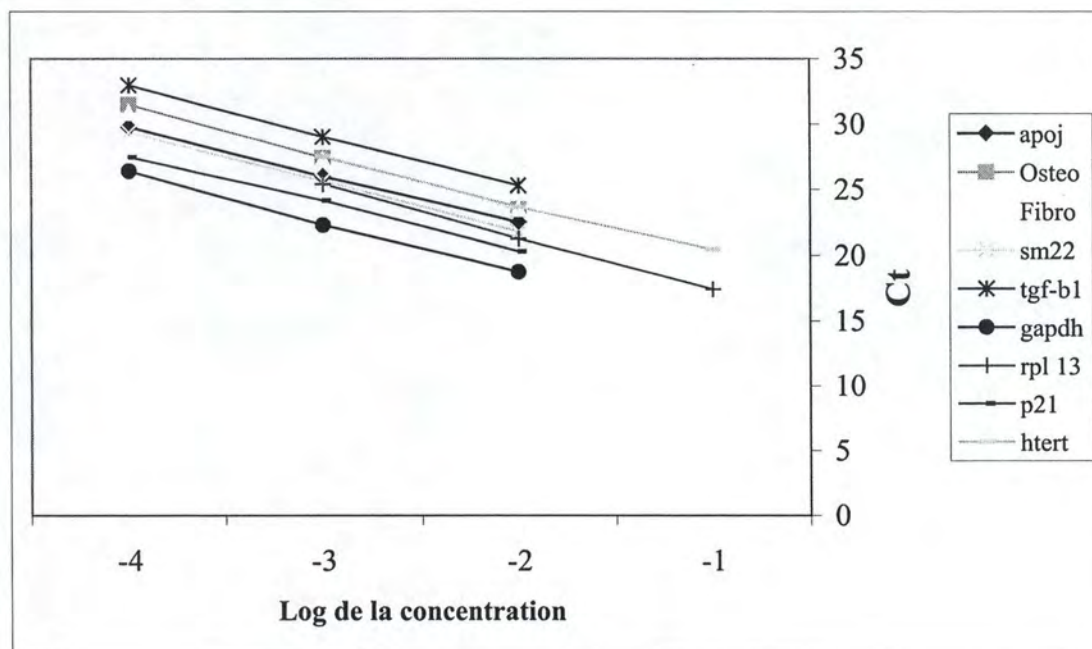
#### b) Quantification du taux de transcrits des gènes d'intérêt dans les différentes conditions testées

On remarque que le niveau d'ARNm des 4 gènes dont le niveau d'ARNm est connu pour être augmenté lors de la SIPS chez les fibroblastes IMR-90, est fortement diminué chez les fibroblastes IMR-90 hTERT stressées. En effet, l'Apo J, la fibronectine sont réprimées alors que l'ostéonectine et la SM22 ne semble pas présenter de variation de niveau d'expression ainsi que le TGF- $\beta$ 1 et hTERT. Seul p21<sup>Waf-1</sup> montre une augmentation de son niveau d'ARNm de 2 fois.

L'ensemble de ces résultats est en concordance avec ceux obtenus avec la technique du damier à ADN.

Suite à une stimulation au TGF- $\beta$ 1, le niveau d'ARNm de la fibronectine, ostéonectine, SM22 et TGF- $\beta$ 1 augmentent respectivement de 6, 3, 2 et 2 fois alors que l'Apo J et hTERT sont réprimés. p21<sup>Waf-1</sup> ne présente pas de variation du niveau

A.



B.

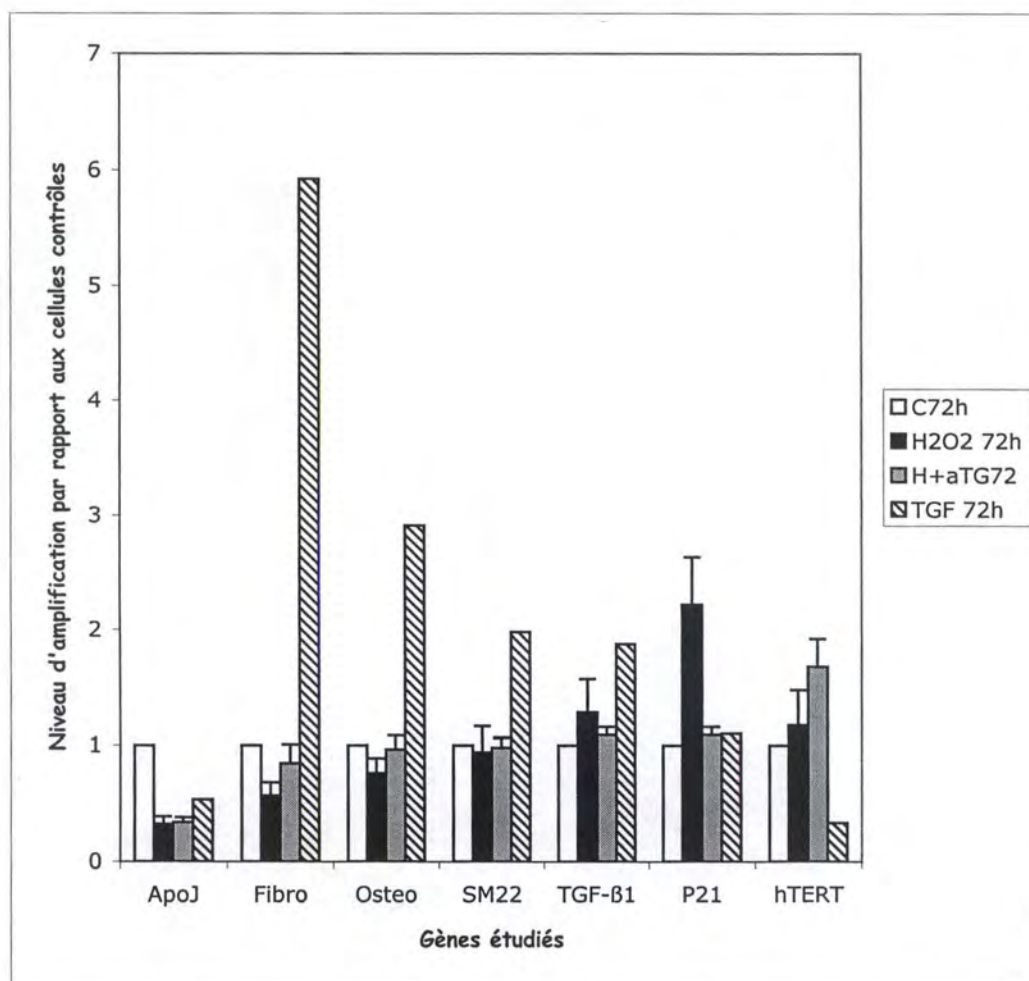
	Pente	Efficiencie
<b>APO J</b>	-3,62	1,88904844
<b>Fibro</b>	-3,65	1,87919826
<b>Osteo</b>	-3,99	1,78084683
<b>SM22</b>	-3,76	1,84483465
<b>TGF-b1</b>	-3,83	1,82430146
<b>GAPDH</b>	-3,82	1,82717483
<b>RPL13A</b>	-3,98	1,78343088
<b>p21</b>	-3,9	1,80472177
<b>hTERT</b>	-3,52	1,92349432

**Figure III-20 :**

A. Graphique représentant les droites standards, réalisées à partir des valeurs de cycle seuil reportées en fonction de la dilution d'ADNc.

B. Les pentes des droites standards obtenues donnent une indication sur l'efficiencie d'amplification du fragment d'ADNc correspondant au gène étudié.





**Figure III-21** : Etude du niveau d'ARNm de plusieurs gènes, 72h après que des IMR-90 hTERT aient été soumises à différents traitements. En blanc : les cellules contrôles, en noir : les cellules stressées sous 200 $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en gris : les cellules stressées +anti-TGF- $\beta$ 1, et en hachuré : les cellules stimulées au TGF- $\beta$ 1. Les résultats ont été normalisés par rapport aux gènes de référence

d'expression. Ces résultats correspondent à ceux obtenus lors de l'hybridation sur la sénéchips.

Suite à un stress à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  avec ajout d'un anticorps neutralisant le TGF- $\beta$ 1, on observe des résultats similaires à ceux obtenus lorsque les cellules IMR-90 hTERT sont soumises à un stress sous  $\text{H}_2\text{O}_2$  sans ajout d'anticorps anti-TGF- $\beta$ 1, excepté pour p21<sup>Waf-1</sup> et pour hTERT. On observe que le niveau d'ARNm des 4 gènes est bien diminué mais que celui de p21<sup>Waf-1</sup> ne présente pas de variation de niveau d'expression. Le niveau d'ARNm de hTERT quant à lui augmente (Figure III-21).



## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

Les fibroblastes humains acquièrent différentes caractéristiques lors de leur vieillissement et lorsqu'ils sont soumis à des stress oxydatifs subcytotoxiques. Parmi celle-ci, on distingue une morphologie sénescence, l'activité  $\beta$ -gal associée à la sénescence (S-A  $\beta$ -gal), le raccourcissement des télomères, des modifications du niveau d'expression de certains gènes ainsi qu'un arrêt irréversible du cycle cellulaire.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au rôle de la télomérase dans l'apparition de ces caractéristiques après un stress sous  $H_2O_2$ .

Plus précisément, nous avons voulu savoir si, d'une part, les fibroblastes de souche IMR-90, immortalisés par la sous-unité catalytique de la télomérase, hTERT, étaient capables d'entrer en sénescence induite prématurément par des stress oxydatifs à l' $H_2O_2$  (SIPS) et si, d'autre part, les mécanismes d'établissement de la SIPS chez les fibroblastes IMR-90 hTERT étaient similaires de ceux connus pour les fibroblastes IMR-90.

De précédents travaux réalisés au laboratoire avec des fibroblastes IMR-90 ont montré que le Transforming Growth Factor  $\beta$ -1 (TGF- $\beta$ 1), dont le niveau d'expression augmente après des stress oxydatifs sous  $H_2O_2$ , était responsable de l'apparition de plusieurs biomarqueurs de la SIPS dont une morphologie sénescence, une augmentation du pourcentage de cellules présentant une activité S-A  $\beta$ -gal ainsi que la surexpression de 4 gènes, l'apo J, la fibronectine, l'ostéonectine et SM22. Par contre, il a également été démontré que le TGF- $\beta$ 1 n'intervient pas dans le blocage irréversible du cycle cellulaire se mettant en place 72 h après un stress à l' $H_2O_2$ . C'est donc tout naturellement que nous avons testé si les biomarqueurs de la SIPS apparaissaient chez les fibroblastes IMR-90 hTERT stressés sous  $H_2O_2$  ou stimulés au TGF- $\beta$ 1. Nous montrons une augmentation de cellules positives pour l'activité S-A  $\beta$ -gal, une nette réduction de potentiel prolifératif ainsi qu'une augmentation du niveau protéique de p21<sup>Waf-1</sup>, 72 h après que les fibroblastes IMR-90 hTERT aient été soumis à un stress à l' $H_2O_2$  pendant 2 h. Par contre, après stimulation avec du TGF- $\beta$ 1, l'apparition de ces 3 biomarqueurs de la SIPS est beaucoup moins marquée. Nos résultats suggèrent donc que les cellules IMR-90 hTERT sont capables d'entrer en SIPS 72 h après un stress unique à l' $H_2O_2$ . D'autre part, il semblerait que le TGF- $\beta$ 1 ne contrôle pas l'apparition des biomarqueurs étudiés. Afin de valider ces résultats, nous avons testé si la neutralisation du TGF- $\beta$ 1, pouvaient empêcher l'apparition des biomarqueurs de la SIPS. Dans ce but, nous avons incubé les cellules avec des anticorps neutralisants spécifiques soit du TGF- $\beta$ 1, soit du récepteur II du TGF- $\beta$ 1, après que les cellules aient été soumises à un stress sous  $H_2O_2$ . Nous montrons que, en présence de ces anticorps, l'apparition des biomarqueurs est aussi marquée que chez les IMR-90 hTERT stressées et non exposées à ces anticorps.

Ces observations suggèrent que le TGF- $\beta$ 1 n'intervient pas dans l'apparition de la S-A  $\beta$ -gal ainsi que dans l'arrêt prolifératif chez ces cellules. Nous nous sommes donc posés la question de savoir si le niveau d'expression du TGF- $\beta$ 1, ainsi que de l'apolipoprotéine J, l'ostéonectine, la fibronectine, et SM22 pouvait augmenter après un stress sous  $H_2O_2$  chez les fibroblastes IMR-90 hTERT. Nous avons montré que la quantité d'ARNm du TGF- $\beta$ 1 et des autres 4 gènes diminuait ou ne changeait pas, 72 h après le stress. Par contre, lorsque les cellules IMR-90 hTERT sont stimulées avec du TGF- $\beta$ 1, ces 5 gènes, à l'exception de l'Apolipoprotéine J, voient leur niveau d'ARNm augmenter. Il semblerait donc que le TGF- $\beta$ 1 soit capable d'induire l'apparition de l'ostéonectine, SM22 et de la fibronectine.







Comment se fait-il dès lors que l'on n'observe pas d'augmentation du niveau d'ARNm de ces 3 gènes, 72 h après que les cellules IMR-90 hTERT aient été soumises au stress ?

Selon le modèle développé par Frippiat *et al* (Figure IV-1), il a été montré que p38<sup>MAPK</sup> activée chez les fibroblastes IMR-90 suite à un stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, induit la surexpression du TGF-β1 et sa libération dans le milieu extracellulaire via l'activation du facteur de transcription ATF-2. Ce TGF-β1 libéré va se lier à son récepteur II ce qui va entraîner une seconde vague d'activation de p38<sup>MAPK</sup> et de ATF-2. Ces activations s'accompagnent par l'apparition de la S-A β-gal, d'une morphologie sénescence et la surexpression des 4 gènes associés à la sénescence. Remarquons que l'apparition de ces biomarqueurs n'apparaissent pas lors de la première vague d'activation de p38<sup>MAPK</sup> et de ATF-2. En effet, 24h après le stress, pRb qui est totalement hypophosphorylé commence à interagir avec ATF-2 phosphorylé ce qui entraîne l'apparition des biomarqueurs de la SIPS. Dans ce modèle, le complexe ATF-2 phosphorylé/Rb hypophosphorylé semble être capable de déclencher la surexpression de ces 4 gènes associés à la sénescence suite à l'inactivation d'E2F par hypophosphorylation de Rb. En effet, il a été montré que E2F en condition normale, limite le niveau d'expression de l'Apo J, de SM22, et de la fibronectine et joue un rôle de répresseur chez les fibroblastes IMR-90 (Frippiat *et al.*, 2002).

Chez les IMR-90 hTERT, on peut émettre l'hypothèse que le TGF-β1 ne serait pas ou peu libéré suite à un stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Un argument allant dans ce sens est qu'aucun changement de niveau d'ARNm du TGF-β1 n'a été détecté 72 h après le stress. Ceci permettrait d'expliquer pourquoi l'on n'observe pas de surexpression des 4 gènes. En effet, l'absence de TGF-β1 n'entraînerait pas toute la cascade de transduction décrite plus haut aboutissant à une phosphorylation d'ATF2 maintenue pendant au moins 24 h. Dès lors, E2F pourrait continuer de jouer son rôle d'activateur faible/répresseur vu qu'il n'entrerait plus en compétition avec le complexe ATF2/Rb. Toutefois il serait intéressant d'étudier le niveau d'expression du TGF-β1 à différents temps après le stress. En effet, Frippiat *et al* ont montré que la quantité d'ARNm du TGF-β1 augmentait chez les fibroblastes IMR-90 soumis à un stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en deux vagues successives, une courte apparaissant 24 h après le stress suivie d'une plus longue et plus tardive, s'étalant de 48 h et à 72 h après le stress (Frippiat *et al.*, 2001). Des vagues de durée différente pourraient exister chez les fibroblastes IMR-90 hTERT.

La seconde partie de ce travail consistait en l'étude de l'expression différentielle chez les fibroblastes IMR-90 hTERT, 72 heures après un stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou une stimulation au TGF-β1. Le damier à ADN « Senechips » constitue un outil analytique qui permet une étude semi-quantitative sur plusieurs centaines de gènes à la fois et donnant des résultats très reproductibles. En effet, des études poussées ont montré que cette technologie donne des résultats présentant une variabilité inférieure à 6 % à partir d'un même échantillon d'ARNm (De Longueville *et al.*, 2002). Dans le cadre de ce mémoire, la Senechips nous a permis de comparer les profils d'expression d'environ 250 gènes impliqués dans la prolifération, l'apoptose, le système de défense, la matrice extracellulaire, etc.

Les fibroblastes en SIPS sont des cellules qui arrêtent de se diviser de manière irréversible tout en restant métaboliquement actives. Ces cellules restent viables *in vitro* pendant au moins 28 jours (Toussaint *et al.*, 1992). En condition normale, il existe un certain équilibre entre les signaux pro et anti-prolifératifs, et les signaux pro et anti-apoptotiques. En SIPS, cet équilibre semble être réorganisé.

Chez les fibroblastes IMR-90 hTERT soumis à un stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le niveau d'ARNm et protéique de p21<sup>waf-1</sup> augmente alors que plusieurs gènes pro-prolifératifs dont certaines cyclines et CDK sont réprimés. L'expression de la télomérase ne semble donc pas interférer avec l'apparition d'un arrêt prolifératif chez les fibroblastes IMR-90 hTERT en SIPS induite par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De plus TERC semble réprimé.



Afin de compléter ce travail, il serait d'une part intéressant de comparer les profils d'expression des fibroblastes IMR-90 hTERT avec ceux que l'on obtiendrait pour les fibroblastes IMR-90. Ceci nous permettra de savoir si, en condition normale, les cellules IMR-90 hTERT présentent beaucoup de différences d'expression de gènes par rapport aux fibroblastes IMR-90. Ces expériences sont en cours. Ensuite, il faudrait établir et comparer des profils d'expression génique de fibroblastes IMR-90 et IMR-90 hTERT soumis à un stress. Nous espérons ainsi obtenir des informations supplémentaires quant au rôle de la télomérase dans l'établissement de la SIPS à partir de l'établissement d'un réseau théorique de modifications d'expression génique. Enfin, pour tester ces réseaux théoriques, il serait intéressant de se focaliser sur l'étude du rôle de quelques-uns de ces gènes dans la SIPS. Selon le gène d'intérêt, nous pourrions soit le surexprimer de manière stable ou non, soit réprimer son expression, soit inhiber son activité biochimique, etc.

En conclusion, certains mécanismes moléculaires responsables de l'apparition de la SIPS chez les fibroblastes IMR-90 hTERT sont similaires de ceux observés pour les fibroblastes IMR-90. En effet, nous avons mis en évidence une diminution du potentiel prolifératif ainsi qu'une augmentation du pourcentage de cellules positives pour la S-A  $\beta$ -gal. Par contre, nous avons mis en évidence que la voie de transduction du signal dirigée par le TGF- $\beta$ 1 ne serait pas impliquée dans la SIPS des cellules IMR-90 hTERT. Enfin, nous avons par ce travail, participé à la validation du damier à ADN à basse densité Senechips, dans le cadre de la problématique de SIPS induite par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## **BIBLIOGRAPHIE**



- Bayreuther, K., Rodemann, H.P., Hommel, R., Dittmann, K., Albiez, M. and Francz, P.I. (1988) Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 5112-5116.
- Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S. and Wright, W.E. (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, **279**, 349-352.
- Chen, D., Li, M., Luo, J. and Gu, W. (2003) Direct interactions between HIF-1 alpha and Mdm2 modulate p53 function. *J Biol Chem*, **278**, 13595-13598.
- Chen, Q.M., Tu, V.C., Catania, J., Burton, M., Toussaint, O. and Dilley, T. (2000) Involvement of Rb family proteins, focal adhesion proteins and protein synthesis in senescent morphogenesis induced by hydrogen peroxide. *J Cell Sci*, **113** ( Pt 22), 4087-4097.
- Chiu, C., Maddock, D.A., Zhang, Q., Souza, K.P., Townsend, A.R. and Wan, Y. (2001) TGF-beta-induced p38 activation is mediated by Rac1-regulated generation of reactive oxygen species in cultured human keratinocytes. *Int J Mol Med*, **8**, 251-255.
- Cristofalo, V.J. (1998) Age dependent modifications of gene expression in human fibroblasts. *Euka Gene Exp*, **8**, 43-80.
- Cristofalo, V.J., Allen, R.G., Pignolo, R.J., Martin, B.G. and Beck, J.C. (1998) Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: a reevaluation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 10614-10619.
- Cui, W., Aslam, S., Fletcher, J., Wylie, D., Clinton, M. and Clark, A.J. (2002) Stabilization of telomere length and karyotypic stability are directly correlated with the level of hTERT gene expression in primary fibroblasts. *J Biol Chem*, **277**, 38531-38539.
- de Longueville, F., Surry, D., Meneses-Lorente, G., Bertholet, V., Talbot, V., Evrard, S., Chandelier, N., Pike, A., Worboys, P., Rasson, J.P., Le Bourdelles, B. and Remacle, J. (2002) Gene expression profiling of drug metabolism and toxicology markers using a low-density DNA microarray. *Biochem Pharmacol*, **64**, 137-149.
- de Magalhaes, J.P., Chainiaux, F., Remacle, J. and Toussaint, O. (2002) Stress-induced premature senescence in BJ and hTERT-BJ1 human foreskin fibroblasts. *FEBS Lett*, **523**, 157-162.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O. and et al. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 9363-9367.
- Dumont, P., Balbeur, L., Remacle, J. and Toussaint, O. (2000a) Appearance of biomarkers of in vitro ageing after successive stimulation of WI-38 fibroblasts with IL-1 alpha and TNF-alpha: senescence associated beta-galactosidase activity and morphotype transition. *J Anat*, **197 Pt 4**, 529-537.
- Dumont, P., Burton, M., Chen, Q.M., Gonos, E.S., Frippiat, C., Mazarati, J.B., Eliaers, F., Remacle, J. and Toussaint, O. (2000b) Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic Biol Med*, **28**, 361-373.
- Dumont, P., Chainiaux, F., Eliaers, F., Petropoulou, C., Remacle, J., Koch-Brandt, C., Gonos, E.S. and Toussaint, O. (2002) Overexpression of apolipoprotein J in human fibroblasts protects against cytotoxicity and premature senescence induced by ethanol and tert-butylhydroperoxide. *Cell Stress Chaperones*, **7**, 23-35.
- Frippiat, C., Chen, Q.M., Zdanov, S., Magalhaes, J.P., Remacle, J. and Toussaint, O. (2001) Subcytotoxic H2O2 stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1,



- which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. *J Biol Chem*, **276**, 2531-2537.
- Frippiat, C., Dewelle, J., Remacle, J. and Toussaint, O. (2002) Signal transduction in H2O2-induced senescence-like phenotype in human diploid fibroblasts. *Free Radic Biol Med*, **33**, 1334-1346.
- Giacomoni, P.U. and D'Alessio, P. (1996) Open questions in photobiology. IV. Photoaging of the skin. *J Photochem Photobiol B*, **33**, 267-272.
- Gorbunova, V., Seluanov, A. and Pereira-Smith, O.M. (2002) Expression of human telomerase (hTERT) does not prevent stress-induced senescence in normal human fibroblasts but protects the cells from stress-induced apoptosis and necrosis. *J Biol Chem*, **277**, 38540-38549.
- Grana. (1995) Cell control in mammalian cells : rôle of cyclins, cycline dependent kinases (CDKs), growth suppressor, genes and cycline-dependent kinase inhibitors (CDKIs). *oncogene*, **11**, 211-219.
- Greider, C.W. and Blackburn, E.H. (1996) Telomeres, telomerase and cancer. *Sci Am*, **274**, 92-97.
- Hanafusa, H., Ninomiya-Tsuji, J., Masuyama, N., Nishita, M., Fujisawa, J., Shibuya, H., Matsumoto, K. and Nishida, E. (1999) Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression. *J Biol Chem*, **274**, 27161-27167.
- Hayflick. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strain. *Cell*, 585-621.
- Hayflick. (1977) The cellular basis for biological aging. *Handbook of the biology of aging*, **159**.
- Hemann, M.T., Strong, M.A., Hao, L.Y. and Greider, C.W. (2001) The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell*, **107**, 67-77.
- Kozian, D.H. and Kirschbaum, B.J. (1999) Comparative gene-expression analysis. *Trends Biotechnol*, **17**, 73-78.
- Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y. and Erusalimsky, J.D. (2000) Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*, **113** ( Pt 20), 3613-3622.
- Martin, G.M., Sprague, C.A. and Epstein, C.J. (1970) Replicative life-span of cultivated human cells. Effects of donor's age, tissue, and genotype. *Lab Invest*, **23**, 86-92.
- Meyne, J., Ratliff, R.L. and Moyzis, R.K. (1989) Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 7049-7053.
- Michel, D., Chatelain, G., North, S. and Brun, G. (1997) Stress-induced transcription of the clusterin/apoJ gene. *Biochem J*, **328** ( Pt 1), 45-50.
- Pardee, A.B. (1974) A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **71**, 1286-1290.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, **29**, e45.
- Rawn. (1990) Biochimie.
- Remacle, J. (1980) Subcellular fraction of WI-38 fibroblasts. Comparaison between young and old cells. *Biochem Biophys Acta*, **630**, 57-70.
- Ryan, K.M., Phillips, A.C. and Vousden, K.H. (2001) Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 332-337.
- Salmon, M. (2002) La PCR en temps réel. *LE TECHNOSCOPE de Biofutur*, **219**, 1-8.
- Saretzki, G., Sitte, N., Merkel, U., Wurm, R.E. and von Zglinicki, T. (1999) Telomere shortening triggers a p53-dependent cell cycle arrest via accumulation of G-rich single stranded DNA fragments. *Oncogene*, **18**, 5148-5158.



- Schulze, A. and Downward, J. (2001) Navigating gene expression using microarrays--a technology review. *Nat Cell Biol*, **3**, E190-195.
- Toussaint, O., Dumont, P., Dierick, J.F., Pascal, T., Fripiat, C., Chainiaux, F., Sluse, F., Eliaers, F. and Remacle, J. (2000a) Stress-induced premature senescence. Essence of life, evolution, stress, and aging. *Ann N Y Acad Sci*, **908**, 85-98.
- Toussaint, O., Houbion, A. and Remacle, J. (1992a) Aging as a multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stages. II. Testing some predictions on aging human fibroblasts in culture. *Mech Ageing Dev*, **65**, 65-83.
- Toussaint, O., Houbion, A. and Remacle, J. (1992b) Aging as a multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stages. Testing some predictions on aging human fibroblasts in culture. *Mech. Ageing Dev.*, **65**, 65-83.
- Toussaint, O., Medrano, E.E. and von Zglinicki, T. (2000b) Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol*, **35**, 927-945.
- Toussaint, O., Remacle, J., Dierick, J.F., Pascal, T., Fripiat, C., Royer, V. and Chainiaux, F. (2002a) Approach of evolutionary theories of ageing, stress, senescence-like phenotypes, calorie restriction and hormesis from the view point of far-from-equilibrium thermodynamics. *Mech Ageing Dev*, **123**, 937-946.
- Toussaint, O., Royer, V., Salmon, M. and Remacle, J. (2002b) Stress-induced premature senescence and tissue ageing. *Biochem Pharmacol*, **64**, 1007-1009.
- Wolowicz, D., Mekki, Y., Ffrench, P., Manel, A.M., Bertrand, Y., Rimokh, R., Philippe, N., Bryon, P.A. and Ffrench, M. (1996) Differential expression of cell proliferation regulatory proteins in B- and T-lineage acute lymphoblastic leukaemias. *Br J Haematol*, **95**, 518-523.

# **ANNEXES**



#	Row	Column	#	Gene symbol	Gene	General function	Gene bank
1	1	1	/	hyb ctl +	Positive hyb ctl		
2	1	2	/	buffer	Detection neg ctl (buffer)		
3	1	3	1	ADAM1	A disintegrin and metalloproteinase domain1	Matrice extracellulaire	XM_090479
4	1	4	2	ADPRT	polysynthetase	Réparation ADN	J03473
5	1	5	/	buffer	Detection neg ctl (buffer)		
6	1	6	3	ANX1	Annexin1	Différentiation (Kératinocyte)	NM_000700
7	1	7	4	AOP2	Anti-oxidant-protein2	Système de défense	NM_004905
8	1	8	5	APOB	ApolipoproteinB		NM_000384
9	1	9	/	buffer	Detection neg ctl (buffer)		
10	1	10	6	APOE	ApolipoproteinE	Matrice extracellulaire	M12529
11	2	1	/	buffer	Detection neg ctl (buffer)		
12	2	2	7	APOJ	ApolipoproteinJ	Système de défense	J02908
13	2	3	8	AREG	Amphiregulin		NM_001657
14	2	4	9	ATM	Ataxia telangiectasia mutated	Cycle cellulaire/ duplication ADN	U26455
15	2	5	10	BAT1	Nuclear-RNA-helicase	Réparation ADN	Z37166
16	2	6	11	BAX	BCL2-associated X protein	Apoptose (+)	NM_004324
17	2	7	12	BCL2	B-cell lymphoma2	Apoptose (-)	NM_000633
18	2	8	13	BCLX	BCLX	Apoptose (-)	NM_001191
19	2	9	14	BMP2	Bone morphogenetic protein2	Apoptose	NM_001200
20	2	10	15	BRCA2	Breast cancer2	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_000059
21	3	1	16	CANX	calnexin	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_001746
22	3	2	17	CASP7	caspase7	Apoptose (+)	NM_001227
23	3	3	/	IS1	IS1		
24	3	4	18	CASP8	Caspase8	Apoptose (+)	X98172
25	3	5	19	CCNA1	cyclinA1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_003914
26	3	6	20	23kd	23KDa Highly basic protein	Synthèse protéique	X56932
27	3	7	21	CCNB1	cyclinB1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_031966
28	3	8	/	IS4	IS4		
29	3	9	22	CCND1	cyclinD1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_053056
30	3	10	/	buffer	Detection neg ctl (buffer)		
31	4	1	23	CCND2	cyclinD2	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_001759
32	4	2	24	CCND3	cyclinD3	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_001760
33	4	3	/	buffer	Detection neg ctl (buffer)		
34	4	4	25	CCNE1	CyclinE	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_001238
35	4	5	26	CCNF	CyclinF	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_001761
36	4	6	27	CCNG	CyclinG	Apoptose	U53328
37	4	7	28	CCNH	cyclinH	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_001239
38	4	8	29	CDC42	Cell division cycle42	Morphologie	NM_001791
39	4	9	30	CDK2	Cyclin dependent kinase2	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_001798
40	4	10	31	CDK4	Cyclin dependent kinase4	Cycle cellulaire/ duplication ADN	U79269

#	Row	Column	#	Gene symbol	Gene	General function	Gene bank
41	5	1	/	Hyb Ctl -	Negative lyb CTL		
42	5	2	32	CENPA	centromere-protein-A	Organisation chromosomique	U14518
43	5	3	33	CENPF	mitosin	Organisation chromosomique	U30872
44	5	4	34	C-FOS	c-fos	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_005252
45	5	5	35	CKB	creatin-kinase-brain	Métabolisme énergétique	M16364
46	5	6	36	COL15A1	collagenXV-alpha1	Matrice extracellulaire	NM_001855
47	5	7	37	COL1A1	Collagen1-alpha1	Matrice extracellulaire	NM_000088
48	5	8	38	Aldo	Aldolase A,	Glycolyse	NM_000034
49	5	9	39	COL3A1	collagenIII-alpha1	Matrice extracellulaire	NM_000090
50	5	10	40	COL6A2	collagenVI-alpha2	Matrice extracellulaire	NM_001849
51	6	1	41	COX1	Prostaglandin endoperoxidase synthase1	Inflammation	NM_000962
52	6	2	42	COX2	Prostaglandin endoperoxidase synthase2	Inflammation	NM_000963
53	6	3	43	Tubu	Alpha-tubulin	Morphologie	NM006082
54	6	4	44	CROC1A	Ubiquitin conjugating enzyme E2 variant1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_003349
55	6	5	45	CST6	cystatin-M	Matrice extracellulaire	U62800
56	6	6	46	CTGF	Connective tissue growth factor	Cycle cellulaire/ duplication ADN	U14750
57	6	7	47	CTSD	cathepsinD	Matrice extracellulaire	NM_001904
58	6	8	48	CTSH	cathepsinH	Matrice extracellulaire	NM_004390
59	6	9	49	CTSS	cathepsinS	Matrice extracellulaire	M90696
60	6	10	50	CTSZ	cathepsinZ	Matrice extracellulaire	AF136273
61	7	1	51	CYT2A	Keratin2	Différentiation (Kératinocyte)	M99063
62	7	2	52	DHFR	Dihydrofolate reductase	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_000791
63	7	3	53	DPT	dermatopontin	Matrice extracellulaire	XM_001897
64	7	4	54	DSG1	desmoglein1	Différentiation (Kératinocyte)	AF097935
65	7	5	55	E2F1	E2F transcription factor1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_005225
66	7	6	56	E2F5	E2F transcription factor5	Cycle cellulaire/ duplication ADN	U31556
67	7	7	57	EAR1	Nuclear receptor subfamily1, group D, member 1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_021724
68	7	8	58	EF1A	Eukaryotic translation elongation factor-alpha1	Organisation chromosomique	AY043301
69	7	9	59	EGR1	Early growth response1	Système de défense	NM_001964
70	7	10	60	EGR2	Early growth response2	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_000399
71	8	1	/	buffer	Detection neg ctl (buffer)		
72	8	2	61	EGR3	Early growth response3	Système de défense	NM_004430
73	8	3	/	IS4	IS4		
74	8	4	62	EIF-4A	Eukaryotic translation initiation factor 4A		NM_001416
75	8	5	63	ACTB	Beta-Actin	Morphologie	NM_001101
76	8	6	64	ELN	elastin	Matrice extracellulaire	NM_000501
77	8	7	65	EPC1	Enhancer of polycomb1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	AF286904
78	8	8	/	IS1	IS1		
79	8	9	66	ETFB	electron-transfert-flavoprotein-beta	Métabolisme énergétique	NM_001985
80	8	10	/	buffer	Detection neg ctl (buffer)		



#	Row	Column	#	Gene symbol	Gene	General function	Gene bank
81	9	1	67	<b>EWSR1</b>	Ewing sarcoma breakpoint region1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_005243
82	9	2	68	<b>FE65</b>	Fe65	Apoptose	L77864
83	9	3	69	<b>FES</b>	Feline sarcoma oncogene	Cycle cellulaire/ duplication ADN	X52192
84	9	4	70	<b>FLG</b>	filaggrin	Différentiation (Kératinocyte)	M60502
85	9	5	71	<b>FMOD</b>	fibromodulin	Matrice extracellulaire	NM_002023
86	9	6	72	<b>FN1</b>	fibronectin	Matrice extracellulaire	X02761
87	9	7	73	<b>G6PD</b>	glucose-6-phosphate-dehydrogenase	Métabolisme énergétique	NM_000402
88	9	8	/	<b>buffer</b>	Detection neg ctl (buffer)		
89	9	9	74	<b>GAA</b>	glucosidase-II-precursor	Métabolisme énergétique	NM_000152
90	9	10	75	<b>GADD153</b>	DNA damage inducible transcript3	Réparation ADN	S40706
91	10	1	76	<b>GLB1</b>	Beta1-galactosidase	Différentiation (Kératinocyte)	M34423
92	10	2	77	<b>GMCSF</b>	Colony stimulating factor2		M11220
93	10	3	78	<b>GPX</b>	glutathione peroxidase	Système de défense	M21304
94	10	4	79	<b>GRB2</b>	Growth factor receptor-bound protein2	Système de défense	NM_002086
95	10	5	80	<b>GSTP1</b>	Glutathione S-transferase pi		NM_000852
96	10	6	81	<b>GSTT1</b>	Glutathione S-transferase theta1		NM_000853
97	10	7	82	<b>H2B/S</b>	histone2b member B/S consensus	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_080593
98	10	8	83	<b>H3FF</b>	histone3 member F consensus	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_003533
99	10	9	84	<b>H4FM</b>	histone4 member M consensus	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_003495
100	10	10	/	<b>Hyb Ctl -</b>	Negative hyb CTL		
101	11	1	85	<b>HBEGF</b>	Heparin binding epidermal growth factor transcript		M60278
102	11	2	86	<b>HLF</b>	Hepatic leukemia factor	Système de défense	M95585
103	11	3	87	<b>HMOX</b>	heme-oxygenase	Système de défense	NM_002133
104	11	4	88	<b>HSP27</b>	Heat shock 27kD protein1	Système de défense	AB020027
105	11	5	89	<b>HSP40</b>	Heat shock 40kD protein1	Système de défense	D49547
106	11	6	90	<b>HSP70</b>	Heat shock 70kD protein1	Système de défense	AB023420
107	11	7	91	<b>HSP70B</b>	Heat shock 70kD protein6	Système de défense	NM_002155
108	11	8	92	<b>cyc</b>	Cyclophilin 33A	Synthèse protéique	AF042385
109	11	9	93	<b>HSP90-alpha</b>	Heat shock 90kD protein1 alpha	Système de défense	X15183
110	11	10	94	<b>ICAM-1</b>	Intracellular adhesion molecule1	Matrice extracellulaire	J03132
111	12	1	95	<b>ID1</b>	Inhibitor of DNA binding1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	X77956
112	12	2	96	<b>ID2</b>	Inhibitor of DNA binding2	Cycle cellulaire/ duplication ADN	M97796
113	12	3	97	<b>IFNG</b>	Interferon gamma	Cytokine	X13274
114	12	4	98	<b>IGF1</b>	Insulin like growth factor1	Facteur de croissance	X57025
115	12	5	99	<b>IGF1R</b>	Insulin like growth factor1 receptor	Facteur de croissance	NM_000875
116	12	6	100	<b>IGFBP2</b>	Insulin growth factor binding protein2	Facteur de croissance	M35410
117	12	7	101	<b>IGFBP3</b>	Insulin growth factor binding protein3	Facteur de croissance	X64875
118	12	8	102	<b>IGFBP5</b>	Insulin growth factor binding protein5	Facteur de croissance	M65062
119	12	9	103	<b>IL10</b>	Interleukin 10	Cytokine	NM_000572
120	12	10	104	<b>IL11</b>	Interleukin 11	Cytokine	NM_000641

#	Row	Column	#	Gene symbol	Gene	General function	Gene bank
121	13	1	/	buffer	Detection neg ctl (buffer)		
122	13	2	105	IL11RA	Interleukin 11-receptor-alpha	Cytokine	U32324
123	13	3	/	IS2	IS2		
124	13	4	106	IL12	Interleukin 12	Cytokine	M65291
125	13	5	107	IL15	Interleukin 15	Cytokine	NM_000585
126	13	6	108	GAPD	Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase	Glycolyse	NM002046
127	13	7	109	IL1A	Interleukin1 alpha	Cytokine	NM000575
128	13	8	/	IS5	IS5		
129	13	9	110	IL1B	Interleukin1 beta	Cytokine	M15330
130	13	10	/	buffer	Detection neg ctl (buffer)		
131	14	1	111	IL2	Interleukin 2	Cytokine	U25676
132	14	2	112	IL3	Interleukin 3	Cytokine	M20137
133	14	3	/	buffer	Detection neg ctl (buffer)		
134	14	4	113	IL4	Interleukin 4	Cytokine	NM_000589
135	14	5	114	IL6	Interleukin 6	Cytokine	NM000600
136	14	6	115	IL8	Interleukin 8	Cytokine	NM_000584
137	14	7	116	INT6	Translation initiation factor3 subunit6	Morphologie	NM_001568
138	14	8	117	IVL	involucrin	Différentiation (Kératinocyte)	M13903
139	14	9	118	JNK1	Mitogen activated protein kinase8	Système de défense	L26318
140	14	10	119	JNK2	Mitogen activated protein kinase9	Système de défense	U09759
141	15	1	/	Hyb Ctl -	Negative hyb CTL		
142	15	2	120	JNKK1	Mitogen activated protein kinase kinase 4	Système de défense	NM_003010
143	15	3	121	JUND	Jun D proto-oncogene	Système de défense	NM_005354
144	15	4	122	Ki-67	Ki-67		NM_002417
145	15	5	123	KNSL5	mitotic-kinesin-like-protein1	Organisation chromosomique	NM_004856
146	15	6	124	KNSL6	mitotic-centromere-associated-kinesin	Organisation chromosomique	NM_006845
147	15	7	125	KRT1	keratin1	Différentiation (Kératinocyte)	NM_006121
148	15	8	126	HK1	Hexokinase I	Enzyme glycolytique	M75126
149	15	9	127	KRT10	keratin10	Différentiation (Kératinocyte)	NM_000421
150	15	10	128	KRT14	keratin14	Différentiation (Kératinocyte)	NM_000526
151	16	1	129	KRT16	keratin16	Différentiation (Kératinocyte)	AF061812
152	16	2	130	KRT17	keratin17	Différentiation (Kératinocyte)	X62571
153	16	3	131	HPRT	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase I	HouseKeeping gene	NM_000194
154	16	4	132	KRT19	Keratin19	Différentiation (Kératinocyte)	NM_002276
155	16	5	133	KRT6A	Keratin6	Différentiation (Kératinocyte)	NM_005554
156	16	6	134	L6	Transmembrane4 superfamily member1		M90657
157	16	7	135	MAP17	Membrane associated protein17		U21049
158	16	8	136	MAX	MAX protein	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_002382
159	16	9	137	MCM2	Mitotin	Réparation ADN	D21063
160	16	10	138	MDM2	MDM2	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_002392



#	Row	Column	#	Gene symbol	Gene	General function	Gene bank
161	17	1	139	MEK1	Mitogen activated protein kinase kinase1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	L11284
162	17	2	140	MEK2	Mitogen activated protein kinase kinase2	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_030662
163	17	3	141	MMP1	matrix metalloproteinase 1	Matrice extracellulaire (Dégradation)	NM_002421
164	17	4	142	MMP10	matrix metalloproteinase 10	Matrice extracellulaire (Dégradation)	NM_002425
165	17	5	143	MMP11	matrix metalloproteinase 11	Matrice extracellulaire (Dégradation)	NM_005940
166	17	6	144	MMP12	matrix metalloproteinase 12	Matrice extracellulaire (Dégradation)	NM_002426
167	17	7	145	MMP13	matrix metalloproteinase 13	Matrice extracellulaire (Dégradation)	NM_002427
168	17	8	146	MMP14	matrix metalloproteinase 14	Matrice extracellulaire (Dégradation)	NM_004995
169	17	9	147	MMP15	matrix metalloproteinase 15	Matrice extracellulaire (Dégradation)	NM_002428
170	17	10	148	MMP2	matrix metalloproteinase 2	Matrice extracellulaire (Dégradation)	NM_004530
171	18	1	/	buffer	Detection neg ctl (buffer)		
172	18	2	149	MMP3	matrix metalloproteinase 3	Matrice extracellulaire (Dégradation)	NM_002422
173	18	3	/	IS5	IS5		
174	18	4	150	MMP7	matrix metalloproteinase 7	Matrice extracellulaire (Dégradation)	NM_002423
175	18	5	151	MDH	Malate dehydrogenase 1	HouseKeeping gene	NM_005917
176	18	6	152	MP1	Metalloprotease1	Matrice extracellulaire (Dégradation)	AF061243
177	18	7	153	MSRA	methionine-sulfoxide-reductase A/peptide	Réparation protéines	AF183420
178	18	8	/	IS2	IS2		
179	18	9	154	MT2A	metallothionein 2A	Système de défense	V00594
180	18	10	/	buffer	Detection neg ctl (buffer)		
181	19	1	155	MVK	mevalonate-kinase		M88468
182	19	2	156	MYBL2	b-myb	Cycle cellulaire/ duplication ADN	X13293
183	19	3	157	MYC	c-myc	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_012333
184	19	4	158	NCK1	NCK adaptor protein1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_006153
185	19	5	159	NF1	neurofibromin1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_000267
186	19	6	160	NGFR	nerve growth factor receptor	Système de défense	M14764
187	19	7	161	NRG1	neuregulin		M94165
188	19	8	/	buffer	Detection neg ctl (buffer)		
189	19	9	162	ODC	Ornithine decarboxylase1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_002539
190	19	10	163	OPG	osteoprotegerin	Matrice extracellulaire	U94332
191	20	1	164	OPN	osteopontin	Migration	NM_000582
192	20	2	165	Oste	osteonectin	Matrice extracellulaire	NM_003118
193	20	3	166	p16	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A	Cycle cellulaire (-)	L27211
194	20	4	167	p21	Cyclin dependent kinase inhibitor 1A	Cycle cellulaire (-)	U03106
195	20	5	168	p27	Cyclin dependent kinase inhibitor 1B	Cycle cellulaire (-)	NM_004064
196	20	6	169	p35	Cyclin dependent kinase5 regulatory subunit1	Cycle cellulaire (-)	NM_003885
197	20	7	170	p53	Tumor protein p53	Cycle cellulaire (-)	AF307851
198	20	8	171	p57	Cyclin dependent kinase inhibitor 1C	Cycle cellulaire (-)	NM_000076
199	20	9	172	PAI1	plasminogen activator inhibitor type1	Matrice extracellulaire	M14083
200	20	10	/	Hyb Ctl -	Negative hyb CTL		

#	Row	Column	#	Gene symbol	Gene	General function	Gene bank
201	21	1	173	PAI2	plasminogen activator inhibitor type2/Urokinase inhibitor	Matrice extracellulaire	J02685
202	21	2	174	PAK	P21 activated kinase1	Morphologie	NM_002576
203	21	3	175	PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM002592
204	21	4	176	PKM2	pyruvate-kinase-muscle	Métabolisme énergétique	M26252
205	21	5	177	PLAU	urokinase		NM_002658
206	21	6	178	PLAUR	urokinase-receptor		NM_002659
207	21	7	179	PLK	Polo-like kinase	Cycle cellulaire/ duplication ADN	U01038
208	21	8	180	PLA2	Phospholipase A2	HouseKeeping gene	M86400
209	21	9	181	POLA2	Polymerase alpha	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_002689
210	21	10	182	PRSS11	Protease serine11		NM_002775
211	22	1	183	PSMA2	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 2	Dégradation protéique	NM_002787
212	22	2	184	PSMA3	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 3	Dégradation protéique	NM_002788
213	22	3	185	PSMC6	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 6	Dégradation protéique	NM_002806
214	22	4	186	PSMD1	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 1	Dégradation protéique	NM_002807
215	22	5	187	PSMD11	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 11	Dégradation protéique	AB003102
216	22	6	188	PSMD12	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 12	Dégradation protéique	NM_002816
217	22	7	189	PSOR1	psoriasis		M86757
218	22	8	190	RAF1	c-raf-1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	X03484
219	22	9	191	RANTES	Small inducible cytokine A5		NM_002985
220	22	10	192	RB1	Retinoblastome1	Cycle cellulaire (-)	NM_000321
221	23	1	/	buffer	Detection neg ctl (buffer)		
222	23	2	193	RET	ret protooncogene	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_000323
223	23	3	/	IS3	IS3		
224	23	4	194	ROR1	R AR related orphan receptorA	Cycle cellulaire/ duplication ADN	U04897
225	23	5	195	RPL3	60S-ribosomal-proteinL3		NM_000967
226	23	6	196	S9	Ribosomal Proteine S9	Synthèse protéique	NM_001013
227	23	7	197	RPS10	ribosomal-protein S10		NM_001014
228	23	8	/	IS6	IS6		
229	23	9	198	RRAS	R-ras	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_006270
230	23	10	/	buffer	Detection neg ctl (buffer)		
231	24	1	199	RRM1	ribonucleotide-reductase M1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_001033
232	24	2	200	S100A10	Calpactin1	Différentiation (Kératinocyte)	M81457
233	24	3	/	buffer	Detection neg ctl (buffer)		
234	24	4	201	S100A11	Calgizzarin	Différentiation (Kératinocyte)	D38583
235	24	5	202	S100A8	calprotectin	Inflammation	NM_002964
236	24	6	203	SHC	SHC transforming protein1	Apoptose	U73377
237	24	7	204	SLK	Ste-20-related serine/threonine kinase	Apoptose	NM_014720
238	24	8	205	SLP2	Stomatin like protein2	Cycle cellulaire/ duplication ADN	AF282596
239	24	9	206	SM22	transgelin	Developpement muscle	M95787
240	24	10	207	SMAD1	Mother against decapentalplegic homol1	Morphologie	U59423



#	Row	Column	#	Gene symbol	Gene	General function	Gene bank
241	25	1	/	Hyb Ctl -	Negative hyb CTL		
242	25	2	208	SNCG	synuclein	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_003087
243	25	3	209	SDS	Serine Dehydratase	HouseKeeping gene	NM_006843
244	25	4	210	SOD2	Superoxide dismutase2	Système de défense	NM_000636
245	25	5	211	SPRR1B	cornifin	Différentiation (Kératinocyte)	NM_003125
246	25	6	212	SRI	sorcin	Système de défense	NM_003130
247	25	7	213	STAT5	Signal transducer and activator of transcription 5A	Cycle cellulaire/ duplication ADN	L41142
248	25	8	214	TBXA2R	Thromboxane-A2-receptor	Cycle cellulaire/ duplication ADN	D38081
249	25	9	215	TERC	telomerase-RNA	Cycle cellulaire/ duplication ADN	U86046
250	25	10	216	TERT	telomerase-reverse transcriptase	Cycle cellulaire/ duplication ADN	AF018167
251	26	1	217	TFAP2A	Transcription factor AP2-alpha	Cycle cellulaire/ duplication ADN	M36711
252	26	2	218	TFAP2B	Transcription factor AP2-beta	Cycle cellulaire/ duplication ADN	X95694
253	26	3	219	TFAP2C	Transcription factor AP2-gamma	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_003222
254	26	4	220	TGFA	TGF-alpha	Facteur de croissance	NM_003236
255	26	5	221	TGFB1	TGF-beta1	Facteur de croissance	NM_000660
256	26	6	222	TGFBR2	TGF-beta-R2	Facteur de croissance	D50683
257	26	7	223	TGM1	transglutaminase1	Différentiation (Kératinocyte)	NM_000359
258	26	8	224	TH	Tyrosine-hydroxylase		NM_000360
259	26	9	225	THBS1	Thrombospondin	Matrice extracellulaire	X14787
260	26	10	226	TIMP1	Tissue inhibitor of metalloproteinase1	Matrice extracellulaire	NM_003254
261	27	1	227	TIMP2	Tissue inhibitor of metalloproteinase2	Matrice extracellulaire	NM_003255
262	27	2	228	TK1	thymidine-kinase	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_003258
263	27	3	/	IS6	IS6		
264	27	4	229	TNFA	tumor necrosis factor alpha	Apoptose/inflammation	NM_000594
265	27	5	230	TFR	Transferrin receptor	HouseKeeping gene	NM_003234
266	27	6	231	TNFB	tumor necrosis factor beta	Apoptose/inflammation	NM_000595
267	27	7	232	TNFRSF1A	TNF-alpha-RI	Apoptose/inflammation	X55313
268	27	8	/	IS3	IS3		
269	27	9	233	TNFRSF1B	TNF-alpha-RII	Apoptose/inflammation	NM_001066
270	27	10	/	buffer	Detection neg ctl (buffer)		
271	28	1	/	hyb ctl -	Positive hyb ctl		
272	28	2	/	buffer	Detection neg ctl (buffer)		
273	28	3	234	TOP2A	topoisomerase2-alpha	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_001067
274	28	4	235	TPA	Plasminogen activator tissue	Matrice extracellulaire	NM_000930
275	28	5	237	TRF1	Telomeric repeat binding factor1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	U40705
276	28	6	237	TYMS	thymidylate-synthetase	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_001071
277	28	7	238	UBE2C	Ubiquitin conjugating enzyme E2C/ubiquitin carrier protein	Dégradation protéique	NM_007019
278	28	8	/	buffer	Detection neg ctl (buffer)		
279	28	9	239	VEGFC	Vascular endothelial growth factor C	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_005429
280	28	10	240	VEGFR1	Vascular endothelial growth factor receptor1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_002019

#	Row	Column	#	Gene symbol	Gene	General function	Gene bank
281	29	1	/	buffer	Detection neg ctl (buffer)		
282	29	2	/	buffer	Detection neg ctl (buffer)		
283	29	3	/	buffer	Detection neg ctl (buffer)		
284	29	4	/	1 ctl +	Positive detection ctl		
285	29	5	/	2 ctl +	Positive detection ctl		
286	29	6	/	3 ctl +	Positive detection ctl		
287	29	7	/	4 ctl +	Positive detection ctl		
288	29	8	/	5 ctl +	Positive detection ctl		
289	29	9	/	6 ctl +	Positive detection ctl		
290	29	10	/	7 ctl +	Positive detection ctl		
291	30	1	/	8 ctl +	Positive detection ctl		
292	30	2	/	9 ctl +	Positive detection ctl		
293	30	3	/	10 ctl +	Positive detection ctl		
294	30	4	/	11 ctl +	Positive detection ctl		
295	30	5	/	buffer	Detection neg ctl (buffer)		
296	30	6	/	buffer	Detection neg ctl (buffer)		
297	30	7	/	buffer	Detection neg ctl (buffer)		
298	30	8	/	buffer	Detection neg ctl (buffer)		
299	30	9	/	buffer	Detection neg ctl (buffer)		
300	30	10	/	buffer	Detection neg ctl (buffer)		



20 JUIN 2003

SECRETARIAT BIOLOGIE  
F.U.N.D.P.  
Rue de Bruxelles, 59  
B 5000 NAMUR (Belgique)  
Tél: 081 / 72 44 19 - Fax 081 / 72 44 20